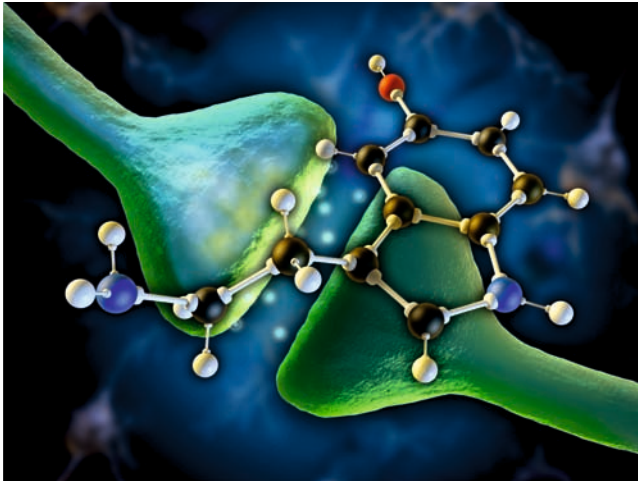


Stephanie Schmidt

Funktionelle Charakterisierung des
neuronal-vesikulären Carriers SLC10A4 und
Etablierung eines Slc10a4-Knockout-Mausmodells



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer : Prof. Dr. Joachim Geyer

Funktionelle Charakterisierung des neuronal-vesikulären Carriers SLC10A4 und Etablierung eines Slc10a4-Knockout-Mausmodells

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Stephanie Schmidt

Tierärztin aus Rottweil

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter : Prof. Dr. J. Geyer
 Prof. Dr. C. Rummel

Tag der Disputation: 4. September 2015

Meinen Eltern Inge und Ulrich in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Man muß das Unmögliche versuchen, um das Mögliche zu erreichen.

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen	VII
Verzeichnis der Tabellen	IX
Verzeichnis der Abkürzungen	X
Vorsätze im Dezimalsystem	XV
Schreibweisen	XV
Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Die SLC10-Transporterfamilie.....	1
1.2 Physiologie des enterohepatischen Kreislaufs	3
1.3 NTCP	4
1.4 ASBT	5
1.5 Weitere Mitglieder der SLC10-Familie	6
1.5.1 SLC10A3	6
1.5.2 SLC10A5	6
1.5.3 SLC10A6/SOAT	6
1.5.4 SLC10A7	7
1.6 SLC10A4	8
1.6.1 Klonierung von SLC10A4/Slc10a4	8
1.6.2 Expression von SLC10A4/Slc10a4	8
1.6.3 Funktionelle Charakterisierung von rSlc10a4/SLC10A4	10
1.6.4 Pathophysiologische Bedeutung von SLC10A4/Slc10a4	10
1.7 Neurotransmission.....	11
1.8 Synaptische Vesikel.....	13
1.9 Die vesikulären Transporter VMAT2, VACHT und VNUT	14
1.9.1 Die vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und 2 (SLC18A1, SLC18A2)	14
1.9.2 Der vesikuläre Acetylcholintransporter VACHT (SLC18A3)	17
1.9.3 Der vesikuläre Nukleotidtransporter VNUT (SLC17A9)	19
1.10 Die neuronalen Plasmamembrantransporter CHT1, DAT und SERT	20
1.10.1 Der Cholintransporter CHT1 (SLC5A7).....	20
1.10.2 Der Dopamintransporter DAT (SLC6A3).....	22
1.10.3 Der Serotonintransporter SERT (SLC6A4)	24

1.11	Die <i>Organic Cation Transporter</i>	25
1.12	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Material	28
2.1	Molekularbiologisches Material	28
2.1.1	Primer	28
2.1.2	cDNA-Klone	29
2.1.3	Restriktionsenzyme	29
2.1.4	Thermostabile DNA-Polymerasen	30
2.1.5	Quantitative <i>Real-Time PCR</i>	31
2.1.6	Vektoren	31
2.1.7	Kommerziell erhältliches Material und Kits	33
2.1.8	Bakterienstämme	34
2.1.9	Puffer und Medien für Bakterien	34
2.2	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.1	Native Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	35
2.3	Zellkultur	36
2.3.1	Zelllinien	36
2.3.2	Zellkulturmedien	37
2.3.3	Antibiotika	38
2.4	Stabile und transiente Transfektion	39
2.4.1	Transfektionsmedien	39
2.4.2	Transfektionsreagenzien	39
2.5	Transportmessungen an eukaryotischen Zellen	40
2.5.1	Puffer und Lösungen für Transportmessungen an eukaryotischen Zellen mit intakter Plasmamembran	40
2.5.2	Puffer und Lösungen für Transportmessungen an eukaryotischen Zellen mit permeabilisierter Plasmamembran	41
2.5.3	Lösungen für Transportmessungen an enzymatisch vorbehandelten Zellen	41
2.5.4	Proteinbestimmung	41
2.6	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	42
2.6.1	Versuchstiere	42
2.6.2	Puffer und Lösungen für die Kultivierung der <i>X. laevis</i> Oozyten	42
2.6.3	Puffer für die Transportmessungen an <i>X. laevis</i> Oozyten	43
2.7	Flüssigszintillation	43
2.8	Immunfluoreszenz	44

2.8.1	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen	44
2.8.2	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an histologischen Organpräparaten	45
2.9	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	46
2.10	Die B6.129S5- <i>S/c10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	47
2.10.1	Tierversuchsanzeige	47
2.10.2	Mausstämme	47
2.10.3	Puffer für die „schnelle“ Isolierung genomischer DNA	47
2.11	Chemische Substanzen	48
2.11.1	Reagenzien	48
2.11.2	Feinchemikalien	50
2.11.3	Radioaktive Substanzen	51
2.12	Geräte	52
2.13	Verbrauchsmaterial	54
2.14	Verbrauchsmaterial im Tierstall	55
2.15	Bioinformatische Programme und Datenbanken	56
3	Methoden	57
3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	57
3.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion proteinhaltiger Lösungen	57
3.1.2	Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol	57
3.1.3	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	57
3.1.4	Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen	58
3.1.5	Aufreinigung der PCR-Amplifikate	58
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	59
3.2	Agarose-Gelelektrophorese	59
3.2.1	Native Agarose-Gelelektrophorese	59
3.2.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	60
3.3	Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	60
3.3.1	Primer Auswahl	61
3.3.2	Touchdown-PCR	62
3.3.3	Multiplex-PCR	62
3.3.4	Quantitative Real-Time PCR	63
3.4	DNA-Klonierung	65
3.4.1	TOPO-Klonierung und Ligation	65
3.4.2	Transformation	66
3.4.3	Subklonierung in den Vektor pcDNA5/FRT/TO-TOPO	66

3.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	66
3.5.1	Mini-Präparation der Plasmid-DNA	66
3.5.2	Midi-Präparation der Plasmid-DNA	67
3.6	Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren	67
3.7	Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA	68
3.7.1	Total-RNA Isolierung aus Zellen und Gewebe	68
3.7.2	cDNA-Synthese aus Total-RNA	69
3.8	Zellkultur	70
3.8.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	70
3.8.2	Passagieren und Aussäen der Zellen	70
3.8.3	Kryokonservierung der Zellen	71
3.8.4	Rekultivierung eingefrorener Zellen	71
3.9	Transfektion eukaryotischer Zellen	71
3.9.1	Transiente Transfektion	71
3.9.2	Stabile Transfektion	72
3.9.3	Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression	73
3.10	Transportmessung an eukaryotischen Zellen	74
3.10.1	Vorbereitung der Transportmessung	74
3.10.2	Aufnahmemessung an Zellen mit intakter Plasmamembran	74
3.10.3	Aufnahmemessungen an enzymatisch vorbehandelten Zellen	75
3.10.4	Aufnahmemessung an Zellen mit permeabilisierter Plasmamembran	75
3.10.5	cis-Hemmung der Neurotransmittertransporter	76
3.10.6	Flüssigszintillationsmessung	76
3.10.7	Proteinbestimmung	76
3.10.8	Auswertung der Experimente	77
3.11	Immunfluoreszenz	77
3.11.1	Indirekte Immunfluoreszenz mit dem Anti-V5-His Antikörper an transfizierten Zellen ...	77
3.11.2	Direkte Fluoreszenz EmGFP-markierter Proteine an transfizierten Zellen	78
3.11.3	Immunfluoreszenz an histologischen Organpräparaten	78
3.12	Mikroskopie	79
3.13	Heterologe Expression in <i>X. laevis</i> Oozyten	80
3.13.1	Tierhaltung	80
3.13.2	<i>X. laevis</i> Oozyten	80
3.13.3	Linearisierung der Plasmid-DNA	80
3.13.4	cRNA-Synthese	81
3.13.5	Entnahme und Aufbereitung der Oozyten	82

3.13.6	Mikroinjektion der cRNA	83
3.13.7	Transportmessung an <i>X. laevis</i> Oozyten	84
3.13.8	Auswertung der Experimente	84
3.14	Methoden zur Arbeit mit der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	85
3.14.1	Maushaltung	85
3.14.2	Entnahme der Biopsien	85
3.14.3	Identifikation der Tiere	85
3.14.4	Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe	86
3.14.5	„Schnelle“ Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe	86
3.14.6	Tötung der Versuchstiere	86
3.14.7	Nomenklatur der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	87
3.14.8	Generierung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	87
3.14.9	Zielvektor TIGM	89
3.14.10	Rückkreuzung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	89
3.14.11	„Speed Congenics“-beschleunigte Rückkreuzung	91
4	Ergebnisse	93
4.1	Sequenzvergleich von SLC10A4 mit anderen Spezies	93
4.2	Klonierung der verwendeten Transporterkonstrukte.....	95
4.2.1	PCR-Amplifizierung, Klonierung und Subklonierung von SLC10A4	95
4.2.2	PCR-Amplifizierung, Klonierung und Subklonierung der Kontrollen VACHT, VMAT2, DAT, CHT1 und SERT	97
4.3	Expression in GripTite 293 MSR-Zellen	98
4.4	Etablierung stabiler Zelllinien	100
4.4.1	Immunfluoreszenz der stabil transfizierten Flp-In T-REx HEK293-Zellen.....	100
4.4.2	Real-Time PCR	102
4.5	Funktionelle Charakterisierung von SLC10A4 in unterschiedlichen Expressionsmodellen.....	103
4.5.1	Transportstudien an GripTite 293 MSR- und Flp-In T-REx HEK293-Zellen über die intakte Plasmamembran.....	103
4.5.2	Transportstudien an Flp-In T-REx HEK293-Zellen über die permeabilisierte Plasmamembran	108
4.5.3	Transportstudien an Flp-In T-REx HEK293-Zellen nach einer Vorinkubation mit der Protease Thrombin	110
4.5.4	Transportstudien an <i>X. laevis</i> Oozyten	112
4.6	Charakterisierung der <i>Slc10a4</i> -Knockout-Mauslinie B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex}	121
4.6.1	Genotypisierung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	121
4.6.2	Analyse des Gendefektes auf Transkriptionsebene.....	123

4.6.3	Analyse des Gendefektes auf Proteinebene	126
4.7	Rückkreuzung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	127
4.8	Phänotypisierung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus.....	129
4.9	Belastungsbeurteilung	129
5	Diskussion	130
5.1	Expressionssysteme für die funktionelle Charakterisierung des <i>orphan carriers</i> SLC10A4	130
5.2	SLC10A4 und die Substrate der SLC10-Familie	132
5.3	SLC10A4: ein aktivierbarer Gallensäuretransporter ?	133
5.4	SLC10A4: ein Wiederaufnahmetransporter für monoaminerge oder cholinerge Neurotransmitter?	135
5.4.1	Dopamin, Noradrenalin und Serotonin	135
5.4.2	Cholin und Acetat	137
5.5	SLC10A4: ein vesikulärer Transporter für Monoamine?	137
5.5.1	Serotonin, Dopamin und Noradrenalin	137
5.5.2	Acetylcholin	138
5.6	SLC10A4 und Mastzellen	139
5.7	SLC10A4: ein alternativer Transporter für die exzitatorischen Neurotransmitter Aspartat und Glutamat?	140
5.8	SLC10A4: ein Transporter für den Kotransmitter ATP?.....	142
5.9	Ausblick	145
5.10	Die Rückkreuzung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus - Zeitverlust oder Notwendigkeit?	145
5.11	Neue Erkenntnisse über die <i>Slc10a4</i> -Knockout-Maus	147
6	Zusammenfassung.....	154
7	SUMMARY	155
8	Literaturverzeichnis.....	156
9	Anhang	177
10	Danksagungen.....	183
11	Erklärung.....	185

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC10-Familie.....	2
Abb. 1.2: NTCP, ASBT und der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren (modif. nach Prof. Geyer)	3
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Neurotransmission an einer Synapse.....	12
Abb. 1.4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Referenztransporter	26
Abb. 3.1: Temperatur- und Zeitverlauf einer Standard-PCR.....	61
Abb. 3.2: Temperatur- und Zeitverlauf einer Touchdown-PCR.....	62
Abb. 3.3: Schematische Darstellung der quantitativen Real-Time PCR mit dem <i>TaqMan</i> System....	64
Abb. 3.4: Prinzip der TOPO-Klonierung	65
Abb. 3.5: Schema einer transienten Transfektion	72
Abb. 3.6: Mikroinjektion in <i>X. laevis</i> Oozyten	84
Abb. 3.7: Erklärterung der Nomenklatur der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	87
Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Generierung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	88
Abb. 3.9: Schema des von TIGM verwendeten Zielvektors	89
Abb. 3.10: Konventionelles Rückkreuzungsschema	90
Abb. 3.11: Zygotiegrad der Rückkreuzungsgenerationen.....	91
Abb. 4.1: Phylogenetischer, radialer Baum des SLC10A4-Proteins des Menschen und ausgewählter Tierarten.....	94
Abb. 4.2: Restriktionsanalyse des SLC10A4-Inserts im pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO-Plasmid und pcDNA6.2/C-EmGFP/YFP TOPO-Plasmid	96
Abb. 4.3: Nachweis transient transfizierter SLC10A4-, CHT1-, DAT-, SERT-, VACHT- und VMAT2-V5-His-Fusionsproteine mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	98
Abb. 4.4: Nachweis transient transfizierter SLC10A4-, CHT1-, DAT-, VACHT- und VMAT2-EmGFP-Fusionsproteine mittels direkter Fluoreszenz	99
Abb. 4.5: Nachweis der SLC10A4-, VACHT-, VMAT2- und DAT-V5-His und –EmGFP- Fusionsproteine nach stabiler Transfektion mittels indirekter Immunfluoreszenz und direkter Fluoreszenz.....	101
Abb. 4.6: Kontrolle der stabilen Flp-In T-REx HEK293-Zelllinien mittels quantitativer Real-Time PCR	102
Abb. 4.7: Aufnahme von Cholin in GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert mit SLC10A4, CHT1 oder Leervektor	104
Abb. 4.8: Aufnahme von Serotonin in GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert mit SLC10A4, SERT oder Leervektor.....	104
Abb. 4.9: Aufnahme von Dopamin in GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert mit SLC10A4, DAT oder Leervektor	105
Abb. 4.10: Aufnahme von Dopamin in stabil transfizierte SLC10A4- und DAT-HEK293-Zellen.....	106
Abb. 4.11: Aufnahme von Noradrenalin in stabil transfizierte SLC10A4- und DAT-HEK293-Zellen ...	107
Abb. 4.12: Aufnahme von ATP in SLC10A4-HEK293-Zellen über kurze Zeitpunkte.....	107

Abb. 4.13: Aufnahme von ATP in SLC10A4-HEK293-Zellen über lange Zeitpunkte.....	108
Abb. 4.14: Aufnahme von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Acetylcholin in Digitonin- permeabilisierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen	109
Abb. 4.15: Aufnahme von ATP in Digitonin-permeabilisierte SLC10A4-HEK293-Zellen	110
Abb. 4.16: Aufnahme von DHEAS, TC, PREGS und LC in stabil transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen nach Vorinkubation mit der Protease Thrombin	111
Abb. 4.17: Aufnahme von TC in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP	112
Abb. 4.18: Aufnahme von TC und LC in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP nach Vorinkubation mit der Protease Thrombin	114
Abb. 4.19: Aufnahme von Dopamin und Histamin in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4, NTCP oder mOct1	115
Abb. 4.20: Signifikant höhere Aufnahme von Serotonin in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4 und SERT	117
Abb. 4.21: Nicht signifikante Aufnahme von Serotonin in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit SLC10A4 und rSlc10a4	118
Abb. 4.22: <i>Scatter Plot</i> der Aufnahme von Serotonin in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit SLC10A4 und rSlc10a4	119
Abb. 4.23: Schema des Wildtyp- und <i>Slc10a4</i> -Knockout-Allels.....	121
Abb. 4.24: Genotypisierung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus.....	123
Abb. 4.25: Lage der Primer für die Analyse auf Transkriptionsebene	124
Abb. 4.26: Nachweis der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus auf mRNA-Ebene	125
Abb. 4.27: Expression von Slc10a4 in der Harnblase einer C57BL/6 Wildtypmaus und einer B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus.....	127
Abb. 5.1: Alignment von SLC10A4/Slc10a4 (Mensch, Maus, Ratte) für die Darstellung der berechneten Thrombinschnittstellen	134
Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Renshaw-Hemmung und der Lokalisation von SLC10A4	140
Abb. 5.3: Darstellung der Strukturformel des verwendeten [³ H]ATP's	143
Abb. 5.4: Schematische Darstellung der Orientierung der Transmembrandomänenstruktur von SLC10A4	144
Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Regulation der vakuolären H ⁺ -ATPase durch Cl ⁻ -Ionen ...	152

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 4.1: Sequenzen experimentell ermittelter SLC10A4-Transkripte verschiedener Spezies	93
Tab. 4.2: Polymerasen und Restriktionsenzyme für die Klonierung der Positivkontrollen.....	97
Tab. 4.3: Aufnahme von [³ H]-markiertem LC, DHEAS, PREGS und E ₁ S in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit cRNA von SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP.....	113
Tab. 4.4: Aufnahme von [³ H]- und [³⁵ S]-markierten Neurotransmittern in <i>X. laevis</i> Oozyten injiziert mit cRNA von SLC10A4 und rSlc10a4.....	116
Tab. 4.5: Rückkreuzung der B6.129S5- <i>Slc10a4</i> ^{tm1Lex} Knockout-Maus	128
Tab. 9.1: Auflistung der SLC10A4-Transkripte verschiedener Spezies	177

Verzeichnis der Abkürzungen

%	Prozent
λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
ΔG	Freie Enthalpie
Abb.	Abbildung
ABC	ATP Binding Cassette
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASBT	Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
b	Base
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serum Albumin
BSEP	Bile Salt Export Pump
CAD	katecholaminerge Tumorzellen der Maus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CarAT	Carnitin-Acetyltransferase
CDCA	Chenodeoxycholat
cDNA	complementary DNA
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CHO	Chinese Hamster Ovary
CHT1	Cholintransporter
Ci	Curie
COS	Nierenzellen der grünen Meerkatze
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
cRNA	complementary RNA
C_T	Signal threshold cycle
CV-1	Affennierenzellen
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4', 6'-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid

DAT	Dopamintransporter
DCA	Deoxycholat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DIDS	4,4-Diisothiocyanatostilbene-2,2-Disulfonat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOPAC	3, 4-Dihydroxyphenylacetat
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
D-Rezeptor	Dopaminrezeptor
EB	Ethidiumbromid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EmGFP	Emerald Green Fluorescence Protein
ENU	Ethyl Nitroso Urea
EPP	Endplattenpotential
E ₁ S	Estron-3-Sulfat
E ₂ S	β-Estradiol-3-Sulfat
Ethinyl-E ₂ -S	Ethinylestradiol-3-O-sulfat
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRT	Flp Recombinase Target
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	Gene of interest
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney

HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HC-3	Hemicholinium-3
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HUGO	Human Genome Organisation
IC ₅₀	Hemmstoffkonzentration, welche die Aufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration um 50 % hemmt
KCl	Kaliumchlorid
K _i	Hemmkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LACS	low-affinity Calcium Aufnahme System
LB	Luria Bertani
LC	Lithocholat
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie- Kopplung
LDL	Low-Density Lipoprotein
Ltk ⁻	murine Fibroblastenzellen
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mAChR	muskarinerger Acetylcholinrezeptor
MASP	Marker-assistiertes Selektionsprotokoll
MCS	Multi Cloning Site
MEPP	Miniaturendplattenpotential
MGB	Minor Groove Binder
min	Minute
MMLV	Murine Moloney Leukaemia Virus
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger RNA
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
N ₂	Stickstoff
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	Non Essential Amino Acids
NET	Noradrenalintransporter
NIH-HS	National Institute of Health Genetically Heterogeneous Rat Stock
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
NSMRI	nichtselektiver Monoamin-Wiederaufnahmehemmer
NS20Y	Neuroblastomzellen der Maus
NT	Neurotransmitter
NTCP	Na ⁺ -Taurocholate Cotransporting Polypeptide
NZY	NZ-amine/yeast extract
OCT	Organic Cation Transporter
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
p	Plasmid
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC12	Phäochromozytomzellen der Ratte
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadische Logarithmus der H ⁺ - Ionenkonzentration
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMT	Plasmamembrantransporter
PNS	Peripheres Nervensystem
PREGS	Pregnenolonsulfat
qPCR	Quantitative PCR
RBL 2H3	basophile Leukämiezellen der Ratte
RCH1	Regulator der Kalziumhomöostase 1
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RP	Reserve Pool
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RRP	Readily Releasable Pool
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
2-SMP	2-Sulfooxomethylpyren
4-SMP	4-Sulfooxomethylpyren
s	Sekunde
SBF	Sodium Bile acid Family
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERT	Serotonintransporter
SLC	Solute Carrier
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen
SN56	neuronale Septumzellen der Maus
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Receptor
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
SSV	Small Synaptic Vesicles
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Taurocholat
TE	Tris-EDTA
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TIGM	Texas A&M Institute for Genomic Medicine
TLCS	Taurolithocholat-3-Sulfat
T _m	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TE671	humane Medulloblastomzelllinie
TetO ₂	Tetrazyklin-Operator
TetR	Tetrazyklin-Repressor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U2SO	humane Osteosarkomzellen
U	Unit
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _{max}	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
VACHT	Vesikulärer Acetylcholintransporter
VAMP	Vesikulärer GABA und Glycin Transporter
VGLUT	Vesikulärer Glutamatttransporter

VIAAT	Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VNUT	Vesikulärer Nukleotidtransporter
VT	Vesikuläre Transporter
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
γ -S-ATP	Adenosin 5'-(γ -thio)-triphosphat

Vorsätze im Dezimalsystem

Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen	Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen
10^{15}	Peta	P	10^{-15}	Femto	f
10^{12}	Tera	T	10^{-12}	Piko	p
10^9	Giga	G	10^{-9}	Nano	n
10^6	Mega	M	10^{-6}	Mikro	μ
10^3	Kilo	k	10^{-3}	Milli	m
10^2	Hekto	h	10^{-2}	Centi	c

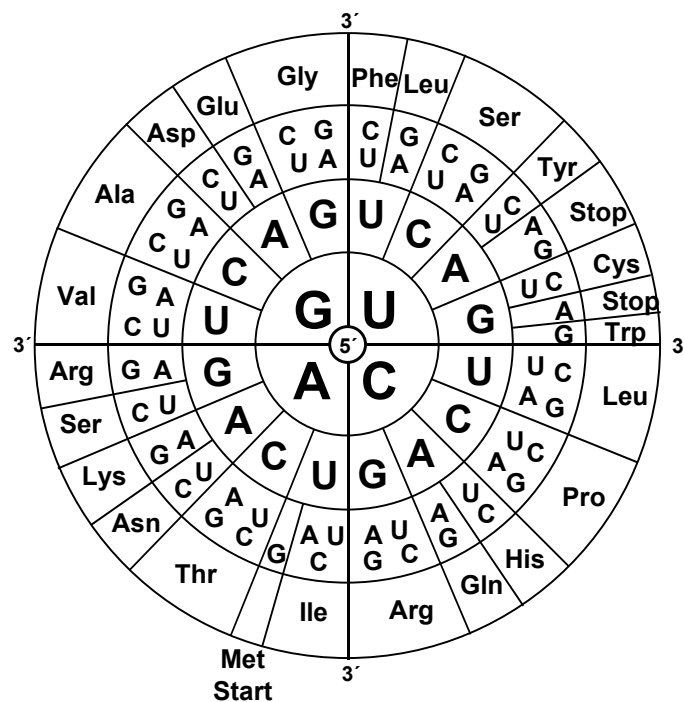
Schreibweisen

Die Schreibweise von Gen- und Proteinennamen ist in dieser Arbeit wie folgt. Das humane Protein wird in Großbuchstaben (SLC10A4) geschrieben und das Protein anderer Spezies, vor allem Maus und Ratte, in kleinen Buchstaben, wobei der Anfangsbuchstabe der Spezies vorangestellt wird (rSlc10a4, mSlc10a4). Dasselbe Prinzip wird für die Bezeichnung der Gene verwendet, allerdings werden diese kursiv geschrieben (*SLC10A4*, *rSlc10a4*, *mSlc10a4*). Bei der Beschreibung von Knockout-Mäusen wird auf eine Speziesunterteilung verzichtet. Die von uns erworbene Knockout-Maus wird als B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus bezeichnet. Mäuse, deren *mSlc10a4*-Gen ebenfalls deletiert wurde, von welchen jedoch keine verlässlichen Daten zum Rückkreuzungsstatus angegeben waren, wurden als *Slc10a4*-Knockout-Mäuse bezeichnet.

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Der genetische Code



1 Einleitung

1.1 Die SLC10-Transporterfamilie

Das *Human Genome Organisation Nomenclature Committee* (HGNC) führt eine Liste der sogenannten *Solute Carrier* (SLC)-Transporterfamilien. Diese beinhalten die „klassischen“ Transporterfamilien (Ionen-gekoppelte Symporter, Antiporter, passive Transporter, usw.) und umfassen derzeit 52 Familien mit insgesamt fast 400 humanen Transportergenen (<http://www.bioparadigms.org>) (Hediger et al. 2013). Die SLC10-Familie wurde bisher in der Literatur als die Familie der Natrium-abhängigen Gallensäuretransporter bezeichnet. Ihre Gründungsmitglieder sind das *Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP; *SLC10A1*) und der *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* (ASBT; *SLC10A2*), welche beide zur Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs von Gallensäuren (GS) beitragen (Alrefai & Gill 2007). In den Jahren 2003 und 2004 wurden an unserem Institut neue Mitglieder dieser Familie entdeckt und kloniert. Diese wurden vom HGNC als *SLC10A4*, *SLC10A5*, *SLC10A6* und *SLC10A7* klassifiziert (Geyer et al. 2006). Eine Voraussetzung für die Zuordnung eines Transporters zu einer bestimmten Familie ist eine Sequenzidentität von mindestens 20-25 % zu anderen Familienmitgliedern (Hediger et al. 2004).

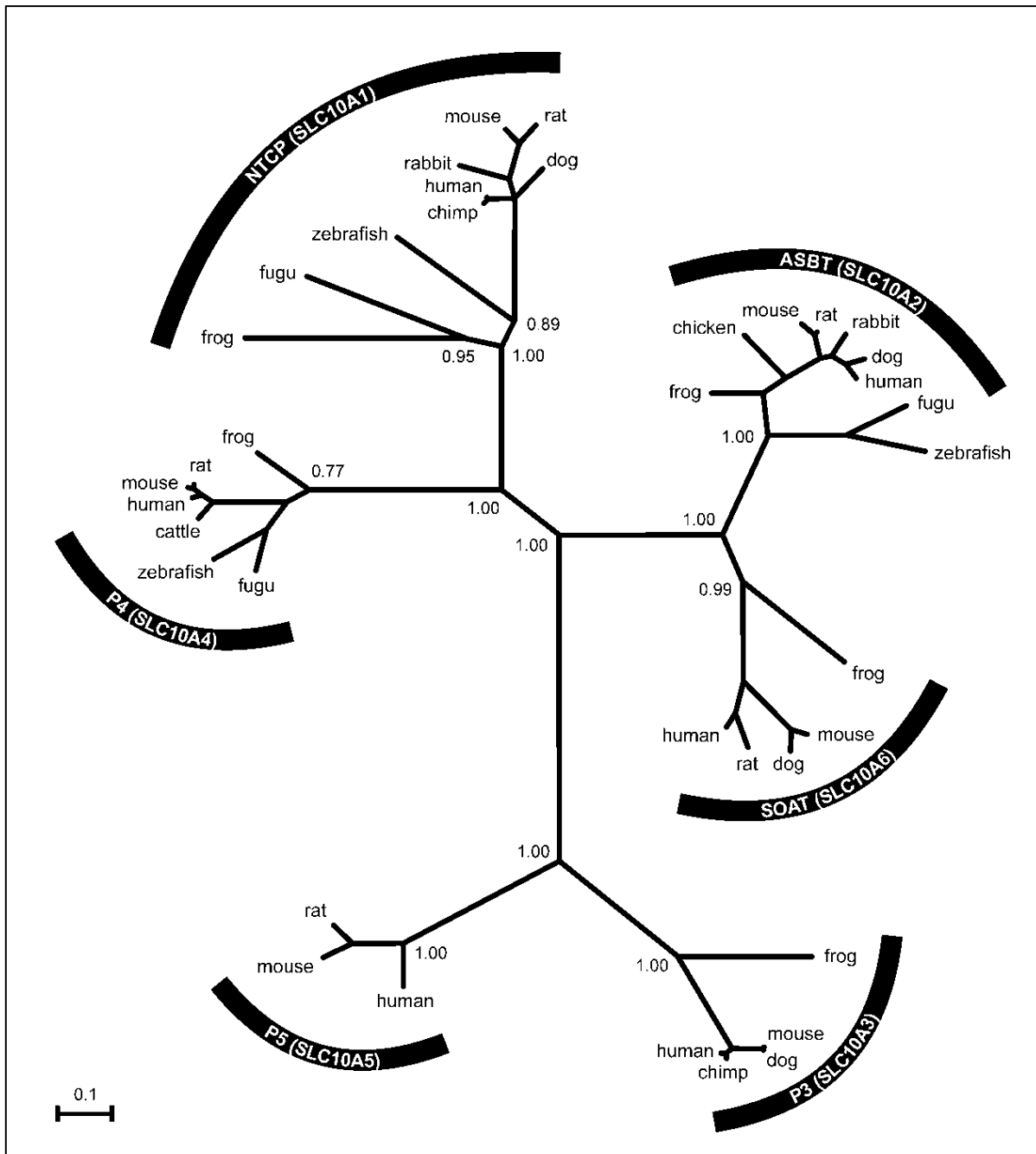


Abb. 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC10-Familie

Der phylogenetische Stammbaum veranschaulicht die Nähe der Sequenzverwandtschaft der SLC10-Familienmitglieder SLC10A1-SLC10A6 auf Proteinebene (aus Geyer et. al 2006).

1.2 Physiologie des enterohepatischen Kreislaufs

Die Gallebildung ist essentiell für die physiologische intestinale Fettverdauung und -aufnahme, für die Cholesterolumöostase, und für die hepatische Ausscheidung lipidlöslicher Xenobiotika, Arzneistoffe und Schwermetalle. GS werden in der Leber aus Cholesterol synthetisiert und in der Gallenblase gespeichert. Die Galle setzt sich zusammen aus GS (~ 67 %), Phospholipiden, Cholesterol und Proteinen. Nach der Nahrungsaufnahme wird die Galle in das Duodenum freigesetzt, wo sie die Absorption von fettlöslichen Vitaminen und Cholesterol erleichtern. Der Großteil der GS (~ 95 %) wird im terminalen Ileum absorbiert und mit dem Portalblut der Leber wieder zugeführt. In der Leber werden die GS aktiv aus dem Portalblut aufgenommen und erneut in die Galle transportiert. Diese Zirkulation der GS zwischen Hepatozyten, Gallenblase, Intestinum und Portalblut wird als enterohepatischer Kreislauf der GS bezeichnet. Die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs ist von unterschiedlichen Transportsystemen abhängig. Unter ihnen befinden sich zwei Mitglieder der SLC10-Familie, welchen eine sehr wichtige Rolle zukommt, die Na^+ -abhängigen Gallensäuretransporter NTCP und ASBT (Hagenbuch & Dawson 2004, Dawson et al. 2009).

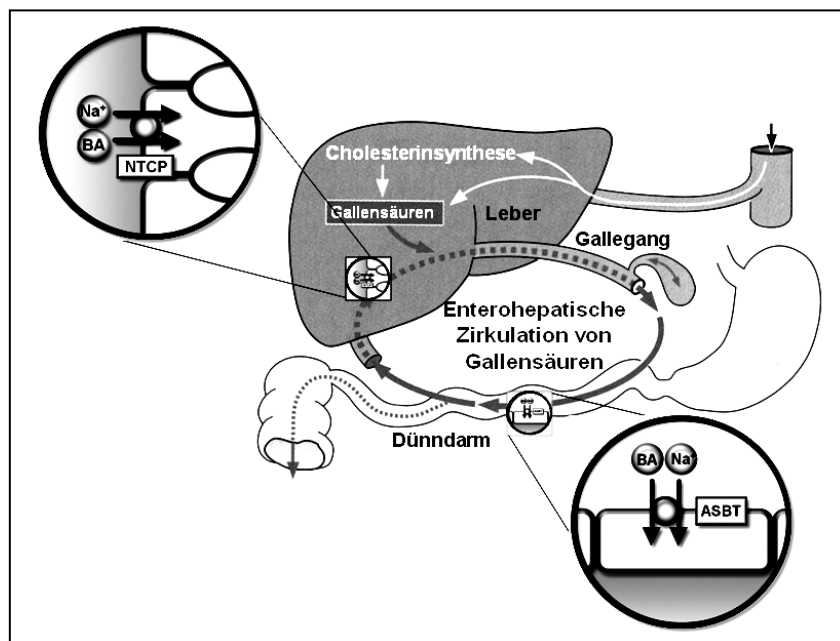


Abb. 1.2: NTCP, ASBT und der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren (modif. nach Prof. Geyer)

NTCP und ASBT sind sehr wichtige Transporter für die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der GS, da sie die zelluläre Aufnahme der GS über die Zellmembranbarrieren in Leber (NTCP) und Intestinum (ASBT) vermitteln (Hagenbuch & Dawson 2004, Geyer et al. 2007).

1.3 NTCP

Das *Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP, *SLC10A1*) ist das Gründungsmitglied der SLC10-Familie. NTCP besteht aus 349 Aminosäuren (Craddock et al. 1998), wird an der sinusoidalen Plasmamembran von Hepatozyten exprimiert (Ananthanarayanan et al. 1994, Stieger et al. 1994) und transportiert GS aus dem Portalblut in die Leberzelle. Der rNtcp wurde auch in der apikalen Membran der Acinus-Zellen des Pankreas lokalisiert (Kim et al. 2002) und durch Expressionsklonierung in *X. laevis* Oozyten isoliert (Hagenbuch et al. 1990, 1991). Weitere Orthologe wurden dann von Mensch (Hagenbuch & Meier 1994), Maus (Cattori et al. 1999) und Kaninchen (Kramer et al. 1999) kloniert. NTCP und ASBT arbeiten beide als elektrogene Na⁺-Kotransporter, welche zwei Na⁺-Ionen pro Molekül Substrat transportieren (Hagenbuch & Meier 1996, Weinman 1997, Weinman et al. 1998, Sun et al. 2006, Masuda et al. 2014). Das Substratspektrum von NTCP ist sehr groß (Döring et al. 2012), es beinhaltet unkonjugierte GS, Glycin- und Taurin-konjugierte GS (Boyer et al. 1994, Hagenbuch & Meier 1994, Platte et al. 1996, Kramer et al. 1999, Hata et al. 2003), sulfatierte GS (Chenodeoxycholat-3-sulfat), sulfatierte Steroidhormone (Estron-3-Sulfat (E₁S), Ethinyl-E₂-Sulfa) (Craddock et al. 1998, Schroeder et al. 1998, Kramer et al. 1999, Han et al. 2010), freie und sulfatierte Thyroidhormone (Friesema et al. 1999, Visser et al. 2010) sowie verschiedene Arzneistoffe, wie z.B. Statine (Fujino et al. 2005, Ho et al. 2006, Choi et al. 2011, Greupink et al. 2011), antimykotische Wirkstoffe (Yanni et al. 2010), das GS-Konjugat Chlorambucil-Taurocholat (Kullak-Ublick et al. 1997) und die Diagnostika zur Überprüfung der Leberfunktion, Bromsulfophthalein (Hata et al. 2003) und Indocyaningrün (de Graaf et al. 2011). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass NTCP als Rezeptor für die Hepatitis Viren B und D fungiert (Yan et al. 2012). Der initiale Schritt ist hierbei die Bindung der myristoylierten preS1-Peptidomäne des großen Hepatitis B-Virus Oberflächenproteins an den NTCP. Diese Bindung behindert die physiologische Transportaktivität des NTCPs. Umgekehrt kann aber auch die Bindung und folglich die Infektion mit dem Hepatitis B-Virus durch NTCP-Inhibitoren und NTCP-Substrate gehemmt werden. Ob sich daraus eine neue Therapieoption ergibt ist allerdings noch unklar (König et al. 2014). Aktuelle *in vivo* Studien an einer *Ntcp*-Knockout-Maus bestätigen, dass *mNtcp* eine zentrale Rolle bei der hepatischen Aufnahme von konjugierten GS und für die Bindung der preS1-Peptidomäne des Hepatitis B-Virus spielt (Slijepcevic et al. 2015).

1.4 ASBT

Der *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* (ASBT, *SLC10A2*) besteht aus 348 Aminosäuren, ist an der apikalen Bürstensaummembran von ilealen Enterozyten exprimiert und transportiert dort GS aus dem Darmlumen in die Darmzellen. Außerdem wurde ASBT bei der Ratte in renalen proximalen Tubuluszellen (Christie et al. 1996, Craddock et al. 1998) und auch in den Epithelzellen der Gallengänge (Alpini et al. 1997, Lazaridis et al. 1997) lokalisiert. Der Asbt wurde ebenfalls mit Hilfe der Expressionsklonierung aus einer ilealen cDNA-Bibliothek des Hamsters isoliert (Wong et al. 1994). Weitere Orthologe folgten aus Ratte (Shneider et al. 1995), Mensch (Oelkers & Dawson 1995), Kaninchen (Kramer et al. 1999b) und Maus (Saeki et al. 1999). Die physiologische Funktion von ASBT liegt in der Rückgewinnung von GS aus Darmlumen und Harn. Das Substratspektrum des ASBT umfasst alle physiologischen Dihydroxy- und Trihydroxy- GS, mit einer Präferenz für Glycin- und Taurin-konjugierte GS über den unkonjugierten GS (Wong et al. 1994, Craddock et al. 1998, Geyer et al. 2006). ASBT besitzt auch eine pathologische Relevanz, denn es ist bekannt, dass vererbare Mutationen im *ASBT*-Gen zu einem Gallensäuremalabsorptionssyndrom führen können. Hierbei handelt es sich um eine idiopathische Erkrankung, welche mit chronischem Durchfall, Fettstuhl, Wachstumsstörung und reduzierten Plasmacholesterolsiegeln assoziiert ist (Oelkers et al. 1997). Diese Ergebnisse wurden durch Studien an einer *Asbt*-Knockout-Maus bestätigt. Die Deletion von *mAsbt* führt zu einer profunden Gallensäuremalabsorption, was in einer erhöhten Ausscheidung von GS (10- bis 20-fach erhöht) über den Stuhl resultiert und auch nicht durch alternative Mechanismen kompensiert werden kann (Dawson et al. 2003).

1.5 Weitere Mitglieder der SLC10-Familie

1.5.1 SLC10A3

Das *SLC10A3*-Gen wurde bereits 1988 aus der humanen Plazenta isoliert und erst nachträglich aufgrund der Sequenzidentität zu ASBT und NTCP (~20 %) in die SLC10-Familie eingeordnet. SLC10A3 besitzt eine sehr weite Gewebeexpression und ist in verschiedenen Tierspezies hoch konserviert (Hagenbuch & Dawson 2004, Geyer et al. 2006). Eine physiologische Funktion ist nicht experimentell bewiesen, aber es wird vermutet, dass SLC10A3 eine *Housekeeping* Funktion besitzt (Alcalay & Toniolo 1988).

1.5.2 SLC10A5

Der *orphan carrier* SLC10A5/Slc10a5 wird bei Mensch, Maus und Ratte am stärksten in Leber, Niere und Dünndarm (nur Ratte) exprimiert. Das SLC10A5-Protein besitzt die höchste Sequenzidentität (33,9 %) zu SLC10A3 und bildet mit diesem eine Subfamilie innerhalb der SLC10-Familie (Geyer et al. 2006). In HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) und U2SO-Zellen (humane Osteosarkomzellen) wurde das SLC10A5-Protein nach transienter Transfektion nicht in der Plasmamembran, sondern intrazellulär, im Golgi-Apparat lokalisiert (Bijmans et al. 2012). Dieses neue Protein zeigt in zwei unterschiedlichen Expressionsmodellen (*X. laevis* Oozyten, HEK293-Zellen) weder eine Transportfunktion für die GS Taurocholat (TC), Cholat, E₁S noch für das Steroidsulfat Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS). Jedoch lässt die Expression in Hepatozyten und im proximalen Tubulus der Niere vermuten, dass es sich um einen hepatischen und renalen Transporter für bisher noch nicht identifizierte Substrate handelt (Fernandes et al. 2007).

1.5.3 SLC10A6/SOAT

Ein weiteres Mitglied der SLC10-Familie ist der *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT, *SLC10A6*), ein natriumabhängiger Transporter für sulfatierte Steroidhormone. Das SOAT-Protein besteht aus 377 Aminosäuren und besitzt eine Topologie von sieben oder neun Transmembrandomänen. Obwohl SOAT die höchste Sequenzidentität zum ASBT (41,8 %) aufweist, handelt es sich nicht um einen Gallensäuretransporter (Geyer et al. 2006). Die erste Klonierung des rSoat erfolgte aus der Nebenniere der Ratte und seine Funktion wurde durch Aufnahmemessungen im Expressionsmodell der *X. laevis* Oozyten identifiziert (Geyer et al. 2004). Für die weitere funktionelle Charakterisierung des humanen Proteins wurde eine SOAT-HEK293-Zelllinie

etabliert, in welcher dann sulfatierte Steroidhormone (DHEAS, 16 α -hydroxy-DHEAS, E₁S, β -Estradiol-3-Sulfat (E₂S), Androstenediol-3-Sulfat, Pregnenolonsulfat (PREGS)), die sulfatierte Gallensäure Tauroolithocholat-3-Sulfat (TLCS), und sulfokonguierte Pyrene (2-SMP, 4-SMP) als Substrate identifiziert wurden (Geyer et al. 2007, Fietz et al. 2013, Schweigmann et al. 2014). Auch die sulfatierten Metabolite des in Soja natürlich vorkommenden Isoflavonoids Daidzein werden von SOAT transportiert (Grosser et al. 2014). Die höchste Expression zeigte sich beim Menschen in Hoden, gefolgt von Plazenta und Pankreas und einer moderaten Expression in Herz, Lunge und Milchdrüse (Geyer et al. 2007). Auch der mSoat wurde in HEK293-Zellen funktionell charakterisiert und wird folglich als ein zu SOAT homologer Transporter bezeichnet (Grosser et al. 2013). Wie auch SLC10A4 (siehe unten), so bildet auch SLC10A6 *in vitro* einen heterodimeren Komplex mit NTCP, führt aber dadurch nicht zu einer verminderten TC-Aufnahme über NTCP (Bijmans et al. 2012).

1.5.4 SLC10A7

Die Zuordnung von SLC10A7 in die SLC10-Familie kann kritisch betrachtet werden, da SLC10A7 nur eine Sequenzidentität von 12-16 % zu den anderen Familienmitgliedern aufweist. Mit einer Sequenzidentität von 20 % hat es eine höhere phylogenetische Verwandtschaft zu bakteriellen Proteinen als zu anderen Mitgliedern der SLC10-Familie (Godoy et al. 2007). Das *SLC10A7*-Gen besteht aus 12 Exonen und zeigt bei Mensch, Ratte, Maus und Frosch eine sehr breite Gewebeexpression. Trotz Membranexpression konnte für SLC10A7 in zwei unterschiedlichen Expressionsmodellen (*Xenopus laevis* Oozyten, HEK293-Zellen) weder eine Transportfunktion für GS noch für Steroidsulfate nachgewiesen werden. In dem Hefepilz *Candida albicans* wurde ein Homolog zu dem humanen SLC10A7-Protein untersucht und als Regulator der Ca²⁺-Homöostase 1 (RCH1) bezeichnet, da seine Deletion zu einer Hypersensitivität für hohe Konzentrationen von extrazellulärem Ca²⁺ und zu einer Toleranz gegenüber Lithium und Azolen führte (Jiang et al. 2012). Somit scheint RCH1 eine funktionelle Komponente des *low-affinity* Kalziumaufnahmesystems (LACS) zu sein (Alber et al. 2013).

1.6 SLC10A4

1.6.1 Klonierung von SLC10A4/Slc10a4

Die rSlc10a4-cDNA wurde im Jahr 2004 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zum ersten Mal aus der Nebenniere der Ratte kloniert. Die Sequenz wurde am 6. Dezember 2004 an die *DDBJ/GenBank/EMBL*-Datenbanken übermittelt und erhielt die Zugangsnummer AY825923 (Geyer et al. 2008). Das klonierte Transkript umfasst 1314 bp und kodiert für das 437 Aminosäuren lange rSlc10a4-Protein der Ratte mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 46,6 kDa (Geyer et al. 2008). Später wurde auch der humane cDNA-Klon generiert, welcher für das humane SLC10A4-Protein von ebenfalls 437 Aminosäuren kodiert (Splinter et al. 2006). SLC10A4 besitzt im Vergleich zu allen anderen Mitgliedern der SLC10-Familie die höchste Sequenzidentität (29,7%) zu NTCP, dem Gallensäuretransporter der Leber. Beide Gene, *SLC10A1* und *SLC10A4*, sind phylogenetisch nahe verwandt und stammen von einem gemeinsamen Vorläufergen ab (Geyer et al. 2006). Im Unterschied zu NTCP, ASBT und SOAT besitzt SLC10A4 jedoch eine zusätzliche N-terminale Domäne aus etwa 60 Aminosäuren mit drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Als weiterer Unterschied ist das hoch konservierte NTCP/ASBT/SOAT-Signaturmotiv „ALGMMPL“, welches in der Transmembrandomäne drei lokalisiert ist, in keiner der SLC10A4/Slc10a4-Sequenzen von Mensch, Ratte und Maus zu finden. Die Membrantopologie von SLC10A4 wurde experimentell auf sieben oder neun Transmembrandomänen mit einem extrazellulären N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus bestimmt (Geyer et al. 2008), dies entspricht der Membrantopologie von NTCP, ASBT und SOAT (Geyer et al. 2006, 2007). Außerdem bildet SLC10A4 *in vitro* einen heterodimeren Komplex mit NTCP (Bijmans et al. 2012), wodurch die Membranexpression von NTCP reduziert und die Aufnahme von TC über die Plasmamembran verhindert wird.

1.6.2 Expression von SLC10A4/Slc10a4

Die Expressionsanalyse wurde mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführt und zeigte ein sehr überraschendes Expressionsmuster. Die höchste und dominante Expression von *SLC10A4/Slc10a4* befindet sich bei Mensch, Ratte und Maus im Gehirn. Bei der Ratte zeigte sich auch eine moderate Expression in der Nebenniere und bei der Maus im Auge, der Prostata und der Präparation des gesamten Gewebes eines Mausembryos (Geyer et al. 2008). In der Immunhistochemie und DAB-Färbung an über 200 Einzelschnitten aus Gehirn und Rückenmark der Ratte, war eine spezifische Expression in cholinergen Regionen des

Zentralen Nervensystems (ZNS) (motorische Neurone des Rückenmarks, Rhombencephalon, mesopontine cholinerge Neurone, cholinerge Regionen des basalen Vorderhirns) detektierbar (Geyer et al. 2008). Weitere Kolokalisationsstudien mit den cholinergen Markern Cholin-Acetyltransferase (ChAT), Vesikulärer Acetylcholintransporter (VACHT) und Cholintransporter (CHT1) haben in der Immunfluoreszenz schließlich bestätigt, dass rSlc10a4 hoch konzentriert in Synapsen cholinergischer Neurone exprimiert wird. Zusätzlich wurden auch Kolokalisationsstudien an der Retina, dem Darmnervensystem, der neuromuskulären Endplatte und parasympathischen Innervationen des peripheren Nervensystems durchgeführt. Hier zeigte sich eine eindeutige Überlagerung der Signale mit VACHT (Burger et al. 2011). Auch eine Expression von mSlc10a4 in den Synapsen der Motoneurone an Renshaw-Zellen und die dortige Kolokalisation mit VACHT wurde von einer anderen Arbeitsgruppe identifiziert (Richards 2009). Weitergehende Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz haben dann aufgezeigt, dass rSlc10a4 in monoaminergen Neuronen und Nervenfasern der *Substantia nigra*, des Rückenmarks und in sympathischen Innervationen mit dem vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2), einem monoaminergen Markerprotein, kolokalisiert. Des Weiteren wurde eine Expression von rSlc10a4 in peritonealen Mastzellen und Gewebemastzellen in der Immunfluoreszenz und in elektronenmikroskopischen Untersuchungen gefunden (Burger et al. 2011). Mittels Western Blot und Immunopräzipitation an Vesikelpräparationen aus dem Gehirn der Ratte, konnte die subzelluläre Lokalisation von rSlc10a4 in synaptischen Vesikeln dargestellt werden, in welchen es mit Synaptophysin, VACHT und VMAT2 kolokalisiert. Bei der Maus wurde die mRNA-Expression im Gehirn im *Striatum*, in cholinergen motorischen Zellkernen, in der *Substantia nigra*, in der *Area tegmentalis ventralis*, im *Locus coeruleus* und in motorischen Neuronen im Rückenmark detektiert. In der Immunhistologie zeigten sich deutliche Signale für mSlc10a4 in den dorsalen *Nuclei raphe*, der *Substantia nigra*, der *pontinen Grauen Substanz* und den *Nuclei hypoglossi* (Larhammar et al. 2014). Beim Menschen ist *SLC10A4* am höchsten exprimiert in Gehirn und Dünndarm mit einer eher moderaten Expression in Kolon, Herz, Prostata und Hoden (Geyer et al. 2008). Die mRNA-Expression von *SLC10A4* ähnelt dem Expressionsmuster des monoaminergen Markerproteins Tyrosin-Hydroxylase (TH) und wurde im humanen Gehirn in der *Substantia nigra*, und deren dopaminergen Projektionsgebieten, *Putamen* und *Nucleus Accumbens* gefunden (Burger et al. 2011). *SLC10A4* zeigt im gealterten humanen Gehirn *post mortem* eine sehr ubiquitäre Proteinexpression, vor allem aber deutliche Signale in cholinergen und monoaminergen Neuronen, wie *Nucleus basalis* (cholinerg), *Substantia nigra* (dopaminerg), *Locus coeruleus* (noradrenerg) und *Nuclei raphe* (serotonerg), und im *Corpus geniculatum laterale* (Popova & Alafuzoff 2013).

1.6.3 Funktionelle Charakterisierung von rSlc10a4/SLC10A4

In funktionellen Studien wurde rSlc10a4 in *X. laevis* Oozyten und HEK293-Zellen exprimiert und die potentielle Aufnahme von radioaktiv-markierten GS (TC, Cholat), Steroidsulfaten (DHEAS, E₁S, PREGS), Acetat und Cholin untersucht. Bisher konnte jedoch für keine der untersuchten Substanzen eine Transportfunktion durch rSlc10a4 nachgewiesen werden (Geyer et al. 2008). SLC10A4 wurde stabil in CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) (Splinter et al. 2006) und transient in HEK293-Zellen (Larhammar et al. 2014) transfiziert. In diesen Zellen wurden die Fluoreszenzsignale von SLC10A4 zum Großteil in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert, aber auch in der Plasmamembran. Jedoch zeigten die Aufnahmemessungen mit der radioaktiv-markierten Gallensäure TC (Splinter et al. 2006) und den Neurotransmittern Dopamin, Serotonin und Acetylcholin (Larhammar et al. 2014) keine Akkumulation in den transfizierten Zelllinien. In der humanen Zelllinie TE671 (Medulloblastomzellen), welche eine endogene Expression von SLC10A4 aufweist, zeigte sich das native Protein in der Immunzytologie ebenfalls intrazellulär und in der Plasmamembran (Abe et al. 2013). In dieser Zelllinie wurde der Zusammenhang zwischen der Transportaktivität von SLC10A4 und dem Vorhandensein des N-Terminus untersucht. Die Vorinkubation mit der Protease Thrombin führt zur Abspaltung des N-Terminus von SLC10A4 und aktiviert dadurch scheinbar die Transportaktivität in der darauffolgenden Aufnahmemessung mit den Substanzen Lithocholat (LC) und TC (Abe et al. 2013). Die sich daraus ergebende mögliche Funktion von SLC10A4 gibt Anreiz zu Spekulationen und wurde zum Teil bereits kommentiert (Borges 2013).

1.6.4 Pathophysiologische Bedeutung von SLC10A4/Slc10a4

Erste interessante Ergebnisse über die physiologische Funktion von mSlc10a4 und eine potentielle Auswirkung auf den Phänotyp der Maus wurden durch die Behandlung von *C57BL/6* Mäusen mit dem chemischen Kanzerogen N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU) erhalten, welches Mutationen gezielt in spezifischen Regionen induziert (Lee, Bokryeon, et al. 2009). Bei dieser sogenannten „peewee“ Maus war *mSlc10a4* das einzige Gen, das nach der Behandlung verändert, d.h. herunterreguliert wurde. Daher wurde Slc10a4 als Kandidatengen für diesen Phänotyp angesehen. Phänotypisch zeigten die Mäuse eine verminderte Anzahl von Nachkommen pro Wurf und Abnormalitäten in der zellulären Proliferation in Knochen, Leber und Hoden. Außerdem fehlte ihnen der juvenile Wachstumsschub, was sich in Zwergwuchs äußerte (Lee, Bokryeon, et al. 2009). Für eine Identifizierung von Genen, welche an der Entwicklung und Äußerung von Angstzuständen beteiligt sind, wurde das Genexpressionsprofil im *Hippocampus* von *NIH-HS* Ratten

verglichen, welche durch vorherige Phänotypisierung in zwei Gruppen eingeteilt worden waren (Díaz-Morán et al. 2013). Die *rSlc10a4*- und auch *rCht1*-Gene waren in der Gruppe der Ratten, welche ein geringeres Angstverhalten zeigten, deutlich herunterreguliert, was auf eine mögliche Rolle von *rSlc10a4* in diesem Krankheitsbild hinweist. In einer weiteren genomweiten Microarray-Analyse wurde das Genexpressionsprofil dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* von Ratten untersucht, da ihre Degeneration in einem starken Zusammenhang mit der Parkinson-Erkrankung steht (Zhou et al. 2011). Dabei wurde *rSlc10a4* als eines der Gene identifiziert, welches spezifisch in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* exprimiert wird. Da beim Menschen die Expression von *SLC10A4* in bestimmten Gehirnregionen, wie z. B. der *Substantia nigra* bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung einsetzt (Jørgensen et al. 2006) und bei einer genomweiten Analyse das *SLC10A4*-Gen als eines der Gene identifiziert wurde, welches am stärksten in der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten herunterreguliert wird (Moran et al. 2006), gehen wir davon aus, dass *SLC10A4* eine wichtige Funktion im Nervensystem zukommt. In einer erst kürzlich publizierten Veröffentlichung wurde nicht nur die regionale Verteilung von *SLC10A4* im gealterten, humanen Gehirn analysiert, sondern auch eine mögliche Verbindung zwischen *SLC10A4* und der neuronalen Degeneration in spezifischen Gehirnregionen bei Alzheimer-Patienten *post mortem* vermutet. Mit einem ansteigenden Schweregrad der pathologischen Veränderungen, welche mit der Alzheimer-Erkrankung assoziiert werden, scheint eine veränderte Expression von *SLC10A4* einherzugehen (Popova & Alafuzoff 2013).

1.7 Neurotransmission

Die chemische Signalübertragung zwischen Neuronen wird als Neurotransmission bezeichnet und findet an hoch differenzierten, anatomischen Strukturen, den sogenannten Synapsen, statt. Die Neurotransmission ist ein sehr komplexes Geschehen, welches das Zusammenspiel unterschiedlicher Systeme erfordert. Zum einen die Synthese, Freisetzung und Speicherung der Neurotransmitter (NT), die Interaktion der NT mit den spezifischen prä- und postsynaptischen Rezeptoren und schließlich die schnelle Entfernung der NT aus dem synaptischen Spalt durch enzymatischen Abbau oder über Transporter (Giros et al. 1991, Giros & Caron 1993). Dafür verwenden die plasmamembranständigen Neurotransmittertransporter die aus dem Na^+ -Gradienten bereitgestellte Energie, welche durch die Na^+/K^+ -ATPase generiert wird. Diese Transporter können die Neurotransmitter nach ihrer Freisetzung wieder in die Synapse aufnehmen und so die effektive Konzentration im synaptischen Spalt und die Verfügbarkeit der Neurotransmitter für eine zeitabhängige Aktivierung der prä- und postsynaptischen Rezeptoren regulieren (Giros & Caron 1993). Eine

chemische Substanz muss die folgenden Kriterien erfüllen um als Neurotransmitter definiert zu werden. Sie muss in den präsynaptischen Neuronen synthetisiert, in synaptischen Vesikeln der präsynaptischen Nervenendigung gespeichert, durch eine Stimulation der Nerven freigesetzt werden können, prä- oder postsynaptische Rezeptoren aktivieren, nach der Rezeptoraktivierung entfernt oder degradiert werden und die exogene Applikation dieser chemischen Substanz muss die postsynaptischen Effekte durch präsynaptische Stimulation imitieren. Momentan gibt es über 100 Substanzen, die diese Kriterien erfüllen und die sich aufgrund ihrer Größe in zwei Kategorien unterteilen lassen. Zum einen in die der Neuropeptide und zum anderen in die der Aminosäuren, wie z. B. Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) oder der Transmitter wie Acetylcholin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin, welche kleiner sind als Neuropeptide (Sámano et al. 2012).

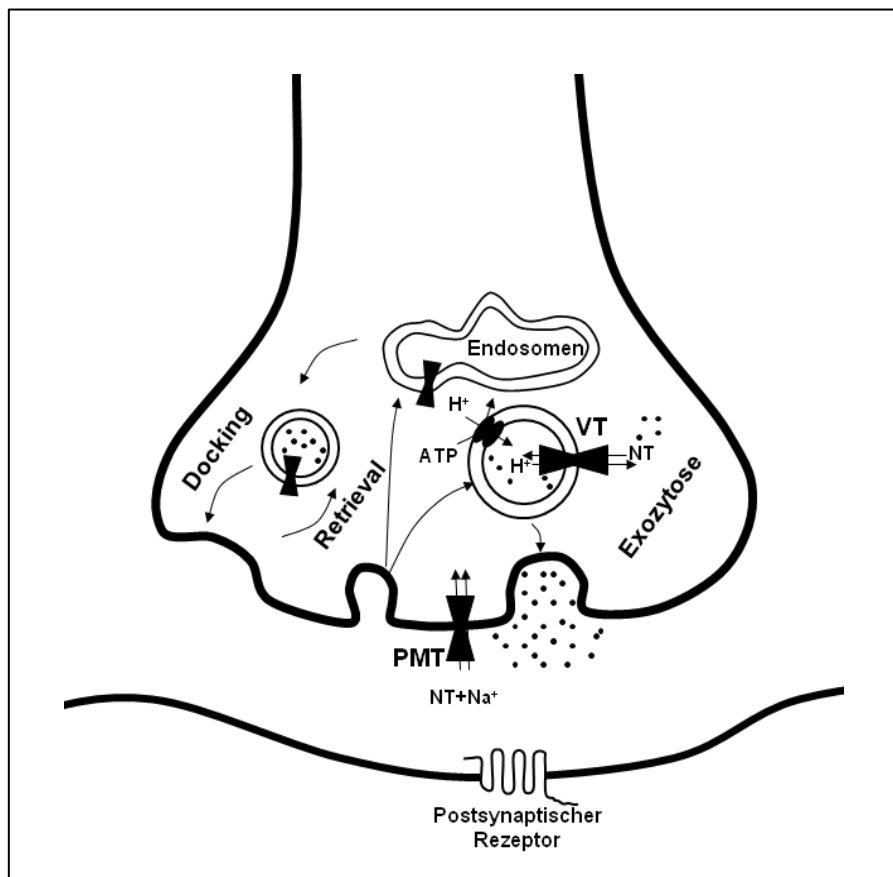


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Neurotransmission an einer Synapse

Neurotransmitter (NT) werden in präsynaptischen Neuronen synthetisiert, über vesikuläre Transporter (VT) in die Vesikel akkumuliert und dort gespeichert. Sie werden nach einem nervalen Impuls exozytotisch in den synaptischen Spalt freigesetzt und aktivieren dort prä- und /oder postsynaptische Rezeptoren. Das Signal wird dann durch enzymatischen Abbau der NT oder durch aktiven Transport in das Zellinnere über Na⁺-abhängige Transporter, die in der Plasmamembran lokalisiert sind (PMT), beendet. Die Aufnahme aller klassischen Neurotransmitter in neurosekretorische Vesikel über vesikuläre Transporter (VT) ist abhängig von einem elektrochemischen Protonengradienten, welcher von der vakuolären H⁺-ATPase generiert wird (Masson et al. 1999, Gether et al. 2006, Blakely & Edwards 2012).

1.8 Synaptische Vesikel

Die fundamentale Einheit der synaptischen Transmission ist das Quantum, die postsynaptische Antwort auf die Freisetzung eines einzigen synaptischen Vesikels (Hnasko & Edwards 2006). Synaptische Vesikel sind einheitlich kleine ($\varnothing \sim 40$ nm), kugelförmige Organellen, bestehend aus einer doppelten Lipidmembran, deren einzige bekannte Funktion die Aufnahme und Freisetzung von Neurotransmittern ist (Sudhof 2004). Sie akkumulieren eine Vielfalt von Neurotransmittern, einschließlich ATP, Acetylcholin, die inhibitorischen Aminosäuren GABA und Glycin, die exzitatorischen Aminosäuren Glutamat, die biogenen Amine Dopamin, Noradrenalin und Serotonin sowie Neuropeptide in hohen Konzentrationen durch einen aktiven Transport (Masson et al. 1999, Edwards 2007). Die Konzentration zytoplasmatischer Monoamine in der Nervenendigung ist im niedrigen mikromolaren Bereich, die in sekretorischen Vesikeln hingegen ca. 10.000-fach höher (Parsons 2000). Dieser Anreicherungsprozess ist abhängig von einem elektrochemischen Gradienten, der von der vakuolären H^+ -ATPase generiert wird, welche ATP-abhängig Protonen in die Vesikel transportiert (Blakely & Edwards 2012). Dadurch wird das Lumen von synaptischen Vesikeln aber auch das von Endosomen, Lysosomen und *dense core* Vesikeln angesäuert (pH-Wert 6,0) und gleichzeitig das Substrat für den Antiport einiger vesikulärer Transporter bereitgestellt (Bankston & Guidotti 1996, Edwards 2007). Die vakuoläre H^+ -ATPase verwendet dafür die Energie, die bei der Hydrolyse von ATP frei wird (Blakely & Edwards 2012) und ist verantwortlich für die Ansäuerung von Endosomen, Lysosomen, *dense core* Vesikeln und synaptischen Vesikeln (Edwards 2007). Auch wenn über die Regulierbarkeit der H^+ -ATPase Aktivität wenig bekannt ist, so gibt es doch Hinweise auf eine indirekte Form der Regulation durch Chlorid (Forgac 2007, Carraro-Lacroix et al. 2009). Synaptische Vesikel werden im Golgi-Apparat aus den *early endosomes* gebildet und dann zu der Nervenendigung transportiert (Hannah et al. 1999). Dort sind die Vesikel in unterschiedlichen Populationen gruppiert. Eine Population besteht aus dem *readily releasable pool* (RRP) und befindet sich in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran. Dort wartet sie auf den nächsten Ca^{2+} -Einstrom um mit der Plasmamembran zu fusionieren und die Neurotransmitter freizusetzen. Der RRP und der sich in seiner Nähe befindende größere *reserve pool* (RP) stellen gemeinsam den *recycling pool* dar. Am weitesten entfernt zu der Nervenendigung befindet sich der *resting pool* (Sudhof 2004, Schweizer & Ryan 2006). Die Anzahl der beteiligten Vesikel in kultivierten Neuronen aus dem *Hippocampus* wurden für den RRP auf 4-8 Vesikel, den RP auf 17-20 Vesikel und den *resting pool* auf 180 Vesikel geschätzt. Bei einer anhaltenden Stimulation werden Vesikel aus dem *reserve pool* für den RRP rekrutiert (Sudhof 2004). Das Andocken der Vesikel an die Plasmamembran wird durch die Proteine des SNARE-Komplexes (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment*

receptor) vermittelt (Rizo & Südhof 2012). Vesikel die mit der Plasmamembran fusionieren können entweder unmittelbar wiederverwendet werden, was als “kiss-and-stay-Mechanismus“ bezeichnet wird, oder sie gelangen in den *reserve pool* (“kiss-and-run“), oder sie werden über den langsameren Weg Clathrin-vermittelt endozytiert (Sudhof 2004).

1.9 Die vesikulären Transporter VMAT2, VACHT und VNUT

In dieser Arbeit wurden aufgrund der Lokalisation von SLC10A4/Slc10a4 die vesikulären Transporter VMAT2 und VACHT und der vesikuläre Nukleotidtransporter (VNUT) als Positivkontrollen verwendet und sollen daher in der Literaturübersicht thematisiert werden.

1.9.1 Die vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und 2 (SLC18A1, SLC18A2)

Die Mitglieder der *Solute Carrier* Familie SLC18 gehören in die Gruppe der Amin/H⁺-Antiporter (Bernstein et al. 2014). Vesikuläre Monoamintransporter ermöglichen die ATP-abhängige Aufnahme biogener Amine/Neurotransmitter in sekretorische Organellen von Neuronen, enterochromaffinen Zellen, Thrombozyten und Mastzellen (Erickson et al. 1992). Der Transport eines protoniertenamins erfolgt im Austausch gegen zwei vesikuläre H⁺-Ionen (Blakely & Edwards 2012) und ist notwendig für die Speicherung in Vesikeln und die spätere Freisetzung der Transmitter via Ca²⁺-stimulierter Exozytose (Rudnick & Wall 1992a, Erickson et al. 1992). Die Antriebskraft für die Aufnahme der NT in die Vesikel setzt sich zusammen aus einer chemischen Komponente ($\Delta\text{pH}\sim 1,5$) und einer elektrischen Komponente ($\Delta\Psi\sim 80\text{ mV}$) (Omote & Moriyama 2013), wobei VMAT2 und VACHT vor allem auf den Protonengradienten (ΔpH) angewiesen sind (Blakely & Edwards 2012). Es wurden zwei Subtypen der vesikulären Monoamintransporter identifiziert; VMAT1 und VMAT2. VMAT1 wird exklusiv in der Peripherie (Sympathisches Nervensystem, adrenale chromaffine Zellen, endokrine/parakrine Zellen des Darms) exprimiert. VMAT2 hingegen wird in Neuronen des ZNS (alle monoaminergen Zellen) und in der Peripherie (enterisches Nervensystem, adrenale chromaffine Zellen, endokrine Zellen des Magens und Thrombozyten) exprimiert (Weihe et al. 1994, Peter et al. 1995). Eine *in situ* Hybridisierung im Rattengehirn zeigt für *rVmat2* deutliche Signale in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* und der *Area tegmentalis ventralis*, in noradrenergen Neuronen des *Locus coeruleus*, *N. tractus solitarius*, A2 und A5 Zellgruppen und in serotonergen Neuronen der *Raphe nuclei* (Liu et al. 1992, Erickson et al. 1992). Für die funktionelle Charakterisierung der vesikulären Monoamintransporter wurden unterschiedliche heterologe Expressionssysteme verwendet. Die für den *rVmat1* kodierende cDNA wurde aus einer cDNA-Bibliothek von PC12-Zellen (Phäochromozytomzellen der Ratte) in CHO-Zellen mit dem Neurotoxin MPP⁺ (N-methyl-4-

phenylpyridin), dem aktiven Metabolit von MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) selektioniert, da die CHO-Zellen bei einer Expression von *rVmat1* eine hohe Resistenz gegen das Toxin besitzen (Liu et al. 1992). Der *rVmat2* wurde aus der cDNA-Bibliothek einer Ratte durch Expressionsklonierung in einer mit Digitonin permeabilisierten CV-1 Zelllinie (Affennierenzellen) isoliert (Erickson et al. 1992). In dieser Zelllinie ist die Aufnahme ATP-abhängig, zeigte einen K_m -Wert von 1,3 μM (Serotonin) und konnte durch das Protonenionophor FCCP (Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon) und tri-(*n*-Butyl)tin, einem Inhibitor der vakuolären H^+ -ATPase verhindert werden. Der VMAT2 wurde kurze Zeit später aus einer humanen cDNA-Bibliothek aus der *Substantia nigra* kloniert und zeigte in einer mit Digitonin permeabilisierten CV-1-Zelllinie einen K_m -Wert von 0,55 μM für Serotonin (Erickson & Eiden 1993). Die vesikulären Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2 bestehen aus 12 Transmembrandomänen mit zytosolischem C- und N-Terminus (Liu et al. 1992, Erickson et al. 1992) und weisen eine Sequenzidentität von ca. 60% auf (Erickson et al. 1996). Trotz dieser nahen Verwandtschaft zeigen sich einige Unterschiede in ihren physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften (Peter et al. 1995). Beide Transporter zeigen eine relativ geringe Substratspezifität, mit der höchsten Affinität für das Substrat Serotonin gefolgt von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, wobei ihre Affinität für VMAT1 zwei- bis dreifach niedriger ist als für VMAT2 (Peter et al. 1994). Eine Ausnahme im Substratspektrum ist Histamin, welches bevorzugt von VMAT2 transportiert wird (Bernstein et al. 2014). Dieser Transport zeigte sich in dem heterologen Expressionsmodell homogenisierter, mit VMAT2 transient transfizierter Membranpräparationen aus COS-1-Zellen (Nierenzellen der Grünen Meerkatze), wobei eine deutlich geringere Aktivität des VMAT2 für Histamin ($K_m \sim 24 \mu\text{M}$) im Vergleich zu Serotonin ($K_m \sim 2 \mu\text{M}$) und auch eine 200-fach geringere Potenz des Inhibitors Reserpin (Histamin $IC_{50} \sim 10 \mu\text{M}$, Serotonin $IC_{50} \sim 50 \text{ nM}$) auffielen (Merickel & Edwards 1995). Reserpin inhibiert VMAT1 und VMAT2 in niedrigen nanomolaren Konzentrationen irreversibel und hat antihypertensive und antipsychotische Wirkungen. Allerdings kann Reserpin auch Parkinson ähnliche Symptome (Depression, gastrische Dysmotilität und extrapyramidale Symptome) hervorrufen (Richman & Tyhurst 1955; Liu & Edwards 1997b; Bernstein et al. 2014). Ein weiterer häufig verwendeter, reversibler Inhibitor ist Tetrabenazin, welches jedoch VMAT2 mit einer deutlich größeren Potenz hemmt als VMAT1. Seine transmitterverarmende Wirkung ist bei hyperdopaminergen Erkrankungen, wie z. B. beim Tourette-Syndrom effizient und es ist seit 2007 in Deutschland für die Therapie der Huntington-Erkrankung zugelassen (Fasano & Bentivoglio 2009, Bernstein et al. 2014).

Der Verlust von *mVmat2* führt in der Maus in homozygoter Ausprägung zu neonatalem Sterben aufgrund verminderter Bewegung und Futteraufnahme. Jedoch ist durch die Gabe von Amphetamin ein Überleben bis in die dritte Lebenswoche möglich (Fon et al. 1997).

Homozygote *Vmat2*-Knockout-Mäuse können keine Monoamine in synaptischen Vesikeln speichern und zeigen trotz einer erhöhten Syntheserate drastisch verminderte Monoaminlevel im Gehirn. In histologischen Untersuchungen der Neugeborenen waren jedoch keine auffälligen Veränderungen in der Gehirnstruktur zu verzeichnen (Fon et al. 1997, Wang et al. 1997). Heterozygote, erwachsene Mäuse zeigen Auffälligkeiten in Entwicklung, Wachstum und Futteraufnahme und verminderte, striatale, extrazelluläre Dopaminlevel (~40 %). Sie reagieren auf die Applikation direkter (Apomorphin) und indirekter (Kokain, Amphetamin) Dopamin-Agonisten sowie Ethanol hypersensitiv, mit einer vermehrten lokomotorischen Aktivität (Wang et al. 1997). Die Applikation von MPP⁺ führt zu einer verstärkten Toxizität in dopaminergen Neuronen (Takahashi et al. 1997) und in der phänotypischen Untersuchung wird ein depressives Verhalten (Anhedonie, Stresssensitivität, reduzierte lokomotorische Aktivität) sichtbar (Fukui et al. 2007). Mäuse, deren *mVmat2*-Expression um ca. 95 % reduziert wurde, weisen ebenfalls profunde Veränderungen der Monoaminhomöostase auf, sind jedoch durchaus bis ins Erwachsenenalter lebensfähig (Mooslehner et al. 2001). Aufgrund ihres Phänotyps sind sie von großem Interesse für die Erforschung verschiedener Aspekte der Symptomatologie der Parkinson-Erkrankung. Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und wird mit dem Botenstoff Dopamin assoziiert. Sie ist definiert durch motorische Symptome (Tremor, Rigidität und Bradykinesie) infolge der Defizite in der dopaminergen synaptischen Transmission. Jedoch werden auch nicht-motorische Symptome, wie autonome, kognitive und neuropsychiatrische Störungen mit ihr assoziiert (Alter et al. 2013). Pathologisch sind einerseits die *Lewy-Körperchen*, welche sich zuerst im dorsalen motorischen Hirnkern im Stammhirn ablagern und sich von dort aus verbreiten und andererseits die Neurodegeneration spezifischer, limitierter Gebiete, wie der dopaminergen Neurone der *Substantia nigra pars compacta*. Zusätzlich wird ein Zellverlust auch im *Locus coeruleus*, in sympathischen Neuronen des peripheren Nervensystems (Noradrenalin) und der *dorsalen Raphe* (Serotonin) beobachtet (Alter et al. 2013). Die Generierung und Verwendung von Tiermodellen (Ratte, Maus, Primaten) der Parkinson-Erkrankung durch z. B. die Applikation der Neurotoxine 6-Hydroxydopamin (Ungerstedt 1968) und MPTP (Langston 1987) haben eine lange Tradition. Bei systemischer Applikation führt MPP⁺ zum Zelltod dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra*, da es selektiv über den Dopamintransporter in das Zytoplasma transportiert wird und dort die mitochondriale Atmung hemmt. Dadurch löst es ein Syndrom aus mit bemerkenswerter klinischer und pathologischer Ähnlichkeit zur idiopathischen Parkinson-Erkrankung (Peter et al. 1995). Bemerkenswert ist, dass die Beseitigung von Dopamin aus dem Zytosol, durch die Akkumulation über den VMAT2 in die Vesikel auch eine Schutzfunktion der Zelle vor den neurotoxischen Abbauprodukten von Dopamin darstellt (Uhl 1998). Auch Umweltgifte (Pestizide, polychlorierte Biphenyle,

bromierte Flammenschutzmittel) werden mit der Parkinson-Pathologie in Zusammenhang gebracht, da sie spezifisch dopaminerge Zellen schädigen, indem sie die Aufnahme von Dopamin über den VMAT2 hemmen und dadurch die toxischen Abbauprodukte von Dopamin im Zytoplasma erhöhen (Chaudhry et al. 2008, Guillot & Miller 2009, Alter et al. 2013, Bernstein et al. 2014). Im Gegensatz dazu wirken Medikamente, die die Aktivität von VMAT2 steigern, wie z. B. Pramipexol, ein D₂/D₃-Rezeptoragonist, welcher für die Parkinson-Therapie verwendet wird, neuroprotektiv (Truong et al. 2003).

1.9.2 Der vesikuläre Acetylcholintransporter VACHT (SLC18A3)

Die cholinerge Neurotransmission erfordert die Aufnahme von extrazellulärem Cholin über den Cholintransporter für die Biosynthese von Acetylcholin im Zytoplasma mit Hilfe des Enzyms Cholin-Acetyltransferase. Darauf folgt die Akkumulation von ACh in synaptische Vesikel über den vesikulären Acetylcholintransporter und schließlich die regulierte exozytotische Freisetzung von ACh in den synaptischen Spalt ausgelöst durch die elektrische Depolarisierung des Neurons (Erickson et al. 1994). Im Anschluß wird ACh durch die extrazelluläre ACh-Esterase zu Cholin und Acetat hydrolysiert und Cholin über den Cholintransporter erneut über die Plasmamembran in die Präsynapse transportiert.

Das *Unc-17*-Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* kodiert für ein Protein, das homolog zu den vesikulären Monoamintransportern der Säugetiere ist. Für dieses wurde eine Rolle in der cholinergen Neurotransmission vermutet (Alfonso et al. 1993). Man fand zunächst Sequenzhomologe im Kalifornischen Zitterrochen *Torpedo californica* und in der Ratte (Roghani et al. 1994). Die funktionelle Charakterisierung eines VACHT-spezifischen Transports konnte *in vitro* in nicht-neuronalen CV-1-Zellen, welche mit dem Rattenproteinhomolog zu *Unc-17* transfiziert waren erstmals dargestellt werden (Erickson et al. 1994). Die Aufnahme von ACh in intakte CV-1-Zellen war ATP-abhängig und durch Vesamicol hemmbar, jedoch war eine kinetische Analyse (K_m -Wert ~ 1 mM) erst durch Aufnahmemessungen an den Zellüberständen homogenisierter, neuroendokriner PC12-Zellen möglich, welche mit dem humanen VACHT stabil transfiziert wurden (Varoqui & Erickson 1996). Der VACHT ist ein *low-affinity, high-capacity* Transporter, was bedeutet, dass er bei physiologischen ACh-Konzentrationen im Zytoplasma der Nervenendigung von 0,2-1 mM *in vivo* wahrscheinlich nicht gesättigt ist (Varoqui & Erickson 1996). Auch Cholin kann über den VACHT aufgenommen werden, selbst wenn die Affinität für ACh siebenmal höher ist (Bravo et al. 2004). VACHT besteht aus 12 Transmembrandomänen mit zytosolischem N- und C-Terminus, ist durch den spezifischen nicht-kompetitiven Inhibitor Vesamicol hemmbar und nutzt den elektrochemischen Gradienten, welcher durch die vakuoläre H⁺-ATPase generiert wird um zwei luminale Protonen gegen ein

zytoplasmatisches Molekül ACh auszutauschen (Prado et al. 2002). Die kodierende mRNA wird exklusiv in cholinergen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert und vom gleichen genetischen Locus wie auch die *ChAT* transkribiert. Eine *in situ* Hybridisierung im ZNS der Ratte zeigte eine Expression in cholinergen Zellgruppen im basalen Vorderhirn, Septum, Basalganglien und motorischen Kerngebieten in Stammhirn und Rückenmark (Roghani et al. 1994). Im peripheren Nervensystem wird VACHT in der neuromuskulären Endplatte, in Fasern der sympathischen und parasympathischen Innervation der abdominalen Ganglien, des Herzvorhofs, des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes, der Bauchspeicheldrüse, des Nebennierenmarks, des männlichen Urogenitaltraktes, der Speicheldrüse und der Tränendrüse exprimiert (Arvidsson et al. 1997). Subzellulär ist VACHT vorherrschend in synaptischen Vesikeln in der Nervenendigung lokalisiert (Gilmor et al. 1996). Die Aktivität von VACHT scheint für die Speicherung von ACh essentiell zu sein, da *Vacht*-Knockout-Mäuse innerhalb von zwei bis fünf min *post natum* zyanotisch an einem Atemversagen versterben (de Castro, De Jaeger, et al. 2009). Deshalb wurden Studien an Mäusen durchgeführt, welche eine verminderte Expression von *mVacht* aufwiesen, und dabei Defizite in der Wiedererkennung von Objekten und Sozialpartnern festgestellt. Die verminderte Freisetzung von ACh an der neuromuskulären Endplatte äußerte sich phänotypisch in einer Myasthenie (Prado et al. 2006). Auch die physiologische Entwicklung der Funktion und Morphologie der neuromuskulären Endplatte ist durch ein Fehlen von *mVacht* gestört (de Castro, Pereira, et al. 2009). Hingegen zeigen Mäuse mit einer erhöhten *mVacht*-Expression *ex vivo* eine erhöhte ACh-Freisetzung im *Hippocampus* (Nagy & Aubert 2012).

In der Humanmedizin sind die cholinergen Neurone, welche vom basalen Vorderhirn zum zerebralen Kortex projizieren, bei der Alzheimer-Erkrankung degeneriert. Der Verlust cholinergischer Neurone kann durch eine verminderte Detektion der spezifischen präsynaptischen cholinergen Marker ChAT und VACHT in diesen Gehirngebieten nachgewiesen werden, welche zusätzlich mit dem Grad der intellektuellen Störung der Alzheimer-Patienten korreliert (Ruberg et al. 1990, Efinger et al. 1997, Chen et al. 2011). Alzheimer ist charakterisiert durch den fortschreitenden Verlust der kognitiven Funktion, welche üblicherweise mit Gedächtnisverlust beginnt und eventuell im weiteren Verlauf der Erkrankung multiple kognitive und neuropsychologische und Verhaltensbereiche beinhaltet. Die Diagnose Alzheimer kann erst *post mortem* anhand der neuropathologischen Veränderungen im Gehirn gestellt werden (Webster et al. 2014).

1.9.3 Der vesikuläre Nukleotidtransporter VNUT (SLC17A9)

ATP ist einer der wichtigsten chemischen Transmitter in der purinergen Signaltransmission und wird vor seiner Freisetzung in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Das Protein, welches unter anderem für die endogene Transportaktivität von ATP in chromaffinen (Bankston & Guidotti 1996) und zymogenen Granula (Haanes & Novak 2010) zuständig ist, war lange Zeit unbekannt. Es wurde schließlich mittels Transportmessungen in Proteoliposomen identifiziert und als vesikulärer Nukleotidtransporter (VNUT) bezeichnet (Sawada et al. 2008). VNUT ist ein neues Mitglied der SLC17-Familie und besteht aus 430 Aminosäuren und 12 Transmembrandomänen. Die Expression ist dominant im Gehirn, vor allem in Kleinhirnrinde, Riechkolben, *Hippocampus* (Larsson et al. 2012) und in der Nebenniere (Sawada et al. 2008). Ebenfalls exprimiert wird VNUT in PC12-Zellen (Sawada et al. 2008), murinen T-Zellen und Jurkat-Zellen (humane Leukämiezellen) (Tokunaga et al. 2010), Geschmackszellen des Typ 2 (Iwatsuki et al. 2009), Calu-3-Zellen (humane Adenokarzinomzellen) (Sesma et al. 2013), Insulin-freisetzenden β -Zellen des Pankreas (Geisler et al. 2013), intestinalen L-Zellen (Harada & Hiasa 2014), Thrombozyten (Hiasa et al. 2014) und in Lysosomen von Astrozyten und Mikroglia (Dou et al. 2012, Oya et al. 2013, Cao et al. 2014). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen kolokalisiert rVnut mit synaptischen Vesikeln in exzitatorischen und inhibitorischen Nervenendigungen des *Hippocampus*, befindet sich aber auch in postsynaptischen Vorwölbungen der Dendriten (Larsson et al. 2012). Zum Substratspektrum gehören nicht nur die Nukleotide ATP, ADP und GTP (Sawada et al. 2008, Larsson et al. 2012), sondern auch divalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} (Miyaji et al. 2011). Wie alle anderen Mitglieder der SLC17-Familie, benötigt auch VNUT Chlorid als einen allosterischen Aktivator der Transportaktivität (Sawada et al. 2008, Miyaji et al. 2011, Larsson et al. 2012) und zeigt eine ähnliche Sensitivität für Inhibitoren, wie z. B. *Evans blau*, DIDS (4,4-Diisothiocyanatostilbene-2,2-Disulfonat) und Ketonkörper (Miyaji et al. 2011). Die Aufnahme von ATP in die Vesikel ist außerdem abhängig vom Membranpotential $\Delta\psi$ (innen positiv) und nicht vom Protonengradienten ΔpH (innen sauer) (Sawada et al. 2008). ATP und andere Nukleotide werden physiologisch von vielen unterschiedlichen Zellen freigesetzt und interagieren mit purinergen P1-Rezeptoren (Adenosin) sowie P2-Rezeptoren (ATP) der Plasmamembran (Abbraccio et al. 2009). Diese werden in zwei Subfamilien klassifiziert, die ionotropen P2X_{1-7} -Rezeptoren und die metabotropen P2Y_{1-14} -Rezeptoren (Burnstock 2009), welche beide in neuronalem Gewebe weit verbreitet sind (Nörenberg & Illes 2000, Fields & Burnstock 2006). Es gibt zwar zwingende Beweise für eine vesikuläre, exozytotische Freisetzung von ATP (Pankratov et al. 2006, 2007), jedoch sind auch zusätzliche Mechanismen der ATP-Freisetzung via ABC-Transporter, Connexin- oder Pannexinhemikanälen, plasmamembranständigen,

spannungsabhängigen Anionenkanälen und P2X₇-Rezeptoren beschrieben (Abbracchio et al. 2009). Um die physiologische Relevanz von *mVnut in vivo* zu ergründen, wurden *Vnut*-Knockout-Mäuse generiert. Auch wenn diese die Fähigkeit für die ATP-Speicherung in Neuronen und neuroendokrinen Zellen eindeutig verloren haben, so sind die Auswirkungen im ZNS zunächst gering, denn die *Vnut*-Knockout-Maus ist lebensfähig und in den basalen phänotypischen Verhaltensanalysen unauffällig. Im Kontrast dazu wurden signifikante Effekte in den neuroendokrinen Zellen (chromaffine Granula, β -Zellen der Langerhans'schen Insel) beobachtet. Zum einen zeigte sich eine erhöhte Glukosetoleranz und zum anderen eine Hypoglykämie nach einer Fastenzeit von 24 Stunden aufgrund einer erhöhten Insulinsensitivität. Insgesamt führte dies zu einer gestörten Regulation der Blutzuckerhomöostase (Sakamoto et al. 2014).

1.10 Die neuronalen Plasmamembrantransporter CHT1, DAT und SERT

Die plasmamembranständigen Neurotransmittertransporter sind verantwortlich für die hochaffine Aufnahme der NT aus dem synaptischen Spalt. Ihre Aktivität ist abhängig von einem elektrochemischen Na⁺-Gradienten, wobei manche zusätzlich einen K⁺-oder Cl⁻-Gradienten benötigen (Masson et al. 1999).

1.10.1 Der Cholintransporter CHT1 (SLC5A7)

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Acetylcholinsynthese ist die Aufnahme der Vorstufe Cholin über den Cholintransporter (CHT1, SLC5A7) (Prado et al. 2013). Der CHT1 gehört zu der Familie der natriumabhängigen Glukosetransporter SLC5 und ist ein hochaffiner, Na⁺- und Cl⁻-abhängiger Transporter für Cholin. Er wurde zunächst aus dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* isoliert und in *X. laevis* Oozyten funktionell charakterisiert (Okuda et al. 2000). Anschließend wurden weitere Orthologe aus Ratte, Mensch und Maus kloniert (Okuda et al. 2000, Apparsundaram et al. 2000, 2001, Okuda & Haga 2000). Das humane *CHT1*-Gen besteht aus neun Exonen, ist auf dem Chromosom 2q12 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 580 Aminosäuren. Die für CHT1 in COS-7-Zellen und *X. laevis* Oozyten ermittelten K_m-Werte befinden sich im niedrigen mikromolaren Bereich (1,2 μ M und 2 μ M) und die Hemmkonstante K_i für den spezifischen Inhibitor Hemicholinium-3 (HC-3) bei 1,3 nM (Apparsundaram et al. 2000, Okuda & Haga 2000). Mittels *in-situ* Hybridisierung und Northern Blot wurde die Expression der mRNA für *CHT1/rCht1* in cholinergen Gehirnregionen (basales Vorderhirn, *Striatum*, Stammhirn, Rückenmark) detektiert (Okuda et al. 2000, Apparsundaram et al. 2000, Okuda

& Haga 2000). Jedoch wurden CHT1 und andere cholinerge Proteine auch in einigen nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen (Ribeiro et al. 2006). Ein Teil der CHT1-Population ist in der präsynaptischen Plasmamembran cholinergischer Neurone lokalisiert, jedoch befindet sich der größere Anteil der Population in synaptischen Vesikeln, die auch VACHT exprimieren. Die subzelluläre Lokalisation von rCht1 befindet sich in der neuromuskulären Endplatte zu mehr als 90 % und im Gehirn von Ratte und Maus zu 71 % in synaptischen Vesikeln (Ferguson et al. 2003, Nakata et al. 2004). Eine Begründung für diese Anordnung ist, dass die Freisetzung von Acetylcholin mittels vesikulärer Exozytose, CHT1 in die Plasmamembran überführt, wodurch die Aufnahme von Cholin für die erneute Synthese von ACh erhöht wird (Ribeiro et al. 2003, Ferguson et al. 2003, Ferguson & Blakely 2004). Auch die heterologe Expression in den unterschiedlichen Zelllinien HEK293, PC12, SN56 (neuronalen Septumzellen der Maus), COS-7 und SH-SY5Y (humane Neuroblastomzellen) zeigte eine prädominante Expression in intrazellulären Kompartimenten (Okuda et al. 2002, Ribeiro et al. 2003, 2007). CHT1 wird durch eine schnelle und kontinuierliche Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert, deren Hemmung durch das Clathrin-Adaptorprotein AP180 oder Dynamin-1 K44A zu einer ansteigenden subzellulären Lokalisation in der Plasmamembran und einer erhöhten Cholinaufnahme in HEK293-Zellen führt (Ribeiro et al. 2003, 2005). Für die konstitutive Internalisierung ist ein Dileucin-ähnliches Motiv am C-Terminus von CHT1 verantwortlich (Ribeiro et al. 2005). Außerdem ist CHT1 essentiell für die Aufrechterhaltung der cholinergen Neurotransmission. Obwohl homozygote *Cht1*-Knockout-Mäuse bei der Geburt morphologisch unauffällig sind, werden sie kurz darauf immobil und zyanotisch und versterben innerhalb einer Stunde *post partum* aufgrund einer respiratorischen Paralyse (Ferguson et al. 2004). Die Deletion von *mCht1* führt im Gehirn der Mäuse zu einem Verlust der HC-3-sensitiven Cholinaufnahme und darauffolgenden ACh-Synthese und zu einer morphologischen Veränderung der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte, deren Ausprägung dem Phänotyp der *Chat*-Knockout-Maus ähnelt (Misgeld et al. 2002, Brandon et al. 2003, Ferguson et al. 2004). Die lebensfähigen und fertilen, heterozygoten *Cht1*-Knockout-Mäuse sind trotz einer verminderten Proteinexpression zu einer funktionellen Kompensation der Transportaktivität in der Lage und wurden als ein Modell für cholinerge Hypofunktion verwendet, um den cholinergen Einfluss an der neuromuskulären Endplatte (Ferguson et al. 2004), im kardiovaskulären System (English et al. 2010), auf das Verhalten (Bazalakova et al. 2007) und die Aufmerksamkeitsfähigkeit (Paolone et al. 2013) zu untersuchen. Die transgene Überexpression von *mCht1* in der Maus führt zu erhöhten ACh-Konzentrationen und zu einer vermehrten motorischen Ausdauer (Holmstrand et al. 2014).

1.10.2 Der Dopamintransporter DAT (SLC6A3)

Sobald Dopamin aus der präsynaptischen Nervenendigung freigesetzt wird, aktiviert es die G-Protein gekoppelten Dopamin-Rezeptoren (D₁-D₅) (Beaulieu & Gainetdinov 2011). Die physiologische Funktion des Dopamintransporters (DAT) ist die Beendigung der Neurotransmission durch die Wiederaufnahme von Dopamin aus dem synaptischen Spalt zurück in die präsynaptische Nervenendigung. Er gehört zur SLC6-Familie der Na⁺ und Cl⁻-abhängigen Neurotransmittertransporter, welche 12 Transmembrandomänen besitzen (Sitte et al. 2002) und auch die Transporter für Noradrenalin, Serotonin, GABA, Glycin, Prolin und Taurin beinhalten (Busch & Saier 2002). Der *rDat* wurde zunächst aus der cDNA einer Ratte kloniert, die Aufnahme von [³H]Dopamin in nicht-neuronalen HeLa-Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms), COS-7-Zellen und *X. laevis* Oozyten charakterisiert (Kilty et al. 1991, Shimada et al. 1991, Giros et al. 1991) und *K_m*-Werte von ~885 nM (Kilty et al. 1991) und ~300 nM (Giros et al. 1991) bestimmt. Anschließend wurden weitere Orthologe aus Rind, Mensch, Maus und nicht-humanen Primaten kloniert (Usdin et al. 1991, Giros et al. 1992, Brüss et al. 1999, Wu & Gu 1999, Miller et al. 2001). Das *DAT*-Gen besteht aus 15 Exonen (Vandenbergh et al. 1992), ist auf dem Chromosom 5p15.3 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit der Länge von 620 AS (Giros et al. 1992). Der DAT wurde aus einer cDNA-Bibliothek der *Substantia nigra* kloniert und zeigt nach stabiler Transfektion in die murine Fibroblastenzelllinie Ltk⁻ eine sättigbare, Na⁺-abhängige Aufnahme von Dopamin (*K_m*-Wert=1,2 µM) und auch von Noradrenalin. Die Aufnahme von Dopamin kann durch Psychostimulanzien (Kokain, Amphetamin und Phencyclidin), Neurotoxine (6-Hydroxydopamin und MPP⁺), Neurotransmitter (Adrenalin, Noradrenalin, GABA und Serotonin), Antidepressiva (Amitriptylin, Bupropion, Desipramin, Mazindol, Nomifensin und Nortriptylin) und weitere zahlreiche Inhibitoren (GBR12783, GBR12909, Amfonelinsäure) gehemmt werden (Giros et al. 1992). Mittels *in situ* Hybridisierung wurde die mRNA-Expression von *rDat* vorherrschend in der *Substantia nigra pars compacta* und in der *Area tegmentalis ventralis* (Kilty et al. 1991, Shimada et al. 1991, Giros et al. 1991) aber auch in der Peripherie des *Bulbus olfactorius* und in bestimmten Regionen des Hypothalamus nachgewiesen (Kilty et al. 1991). In immunhistologischen Untersuchungen am Gehirn der Ratte wurde die Proteinexpression von rDat in Regionen, die reich an dopaminergen Innervationen sind, wie *Neostriatum*, *Tuberculum olfactorium*, *Nucleus accumbens* sowie in der Ursprungsregion der meisten mesolimbischen/mesostriatalen Axone, der *Substantia nigra* und *Area tegmentalis ventralis* detektiert (Ciliax et al. 1995). Auf subzellulärer Ebene wurde rDat in der Plasmamembran von Dendriten und Axonen nigrostriataler, dopaminergener Neurone lokalisiert, jedoch bevorzugt in der perisynaptischen Region (Nirenberg et al. 1996). Die Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Dopamintransporter wird durch

konstitutive und regulatorische Endozytose-Mechanismen kontrolliert. Ein Beispiel dafür ist die Aktivierung der Proteinkinase C, welche zu einer Herabregulation der Aktivität und einer verminderten Expression von DAT an der Zelloberfläche führt (Holton et al. 2005). Auch die Psychostimulanzien Amphetamin und Kokain und das physiologische Substrat Dopamin selbst beeinflussen die Oberflächenexpression von DAT (Zahniser & Sorkin 2004, 2009). Dopamin entsteht aus Tyrosin über den Zwischenschritt L-Dopa, durch die Enzyme TH und Dopadecarboxylase. Die TH wird auch in anderen monoaminergen Neuronen exprimiert und ist kein spezifischer Marker für dopaminerge Neurone (Ciliax et al. 1995). Dopamin wird auch außerhalb des ZNS in dem sogenannten nicht-neuronalen katecholaminergen System synthetisiert. Dazu gehören die mesenterischen Organe Pankreas, Duodenum (Mezey et al. 1996), Parietalzellen im Magen (Hunyady et al. 1997), Niere (Goldstein et al. 1995), Lunge, Retina (Mitsuma et al. 1998), Lymphozyten (Amenta et al. 2001) und Milz, welche insgesamt fast die Hälfte des im Körper synthetisierten Dopamins bilden (Eisenhofer et al. 1997).

Die homozygote *Dat*-Knockout-Maus ist lebensfähig und fertil, neigt jedoch zu einem frühzeitigen Versterben. Sie zeigt eine spontane Hyperaktivität aufgrund einer extrem verlangsamten Elimination des neuronal freigesetzten Dopamins und keine vermehrte motorische Aktivität durch die Applikation von Amphetamin und Kokain (Giros et al. 1996, Jones et al. 1998), sondern eine paradoxe verminderte Aktivität auf die Gabe von Amphetamin (Spielewoy et al. 2001). Des Weiteren führt die Deletion von *mDat* in der Maus zu einer Hypoplasie der Adenohypophyse, was in Zwergwuchs und fehlender Laktation *post partum* resultiert (Bossé et al. 1997), zu einer beeinträchtigten räumlichen Wahrnehmung (Gainetdinov et al. 1999) und zu einer unzulänglichen sensorischen Reizverarbeitung (Ralph et al. 2001). Auch Verhaltensstörungen (Spielewoy et al. 2000) und unflexibles Verhalten in der sozialen Interaktion (Rodríguez et al. 2004) wurden beobachtet. Außerdem besitzt *mDat* eine wichtige Rolle in der Schlafregulation (Wisor et al. 2001), der Skelettbildung (Blizotes et al. 2000) und der Modulation der Motilität des distalen Kolons (Walker et al. 2000).

1.10.3 Der Serotonintransporter SERT (SLC6A4)

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Serotoninsynthese ist die Verfügbarkeit der Aminosäure Tryptophan. Durch die Tryptophan-Hydroxylase wird diese umgewandelt zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) und zu Serotonin durch die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (Owens & Nemeroff 1998). Nach der Freisetzung in den synaptischen Spalt aktiviert es die Serotoninrezeptoren und wird dann über den Serotonintransporter (SERT) wieder in die präsynaptische Nervenendigung aufgenommen. Dieser gehört zur SLC6-Familie der Na^+ - und Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter, welche 12 Transmembrandomänen besitzen und deren C- und N-terminalen Domänen intrazellulär lokalisiert sind (Chen et al. 2004). Der *rSert* wurde zunächst aus dem Gehirn einer Ratte und aus einer RBL 2H3-Zelllinie (basophile Leukämiezellen der Ratte) isoliert (Hoffman et al. 1991, Blakely et al. 1991). Die Aufnahme von [^3H]Serotonin wurde in nicht-neuronalen COS-Zellen und CV1-Zellen charakterisiert und K_m -Werte von ~ 530 nM bestimmt. Der Serotonintransport wird durch die Antidepressiva Fluoxetin, Paroxetin, Citalopram und Clomipramin spezifisch gehemmt (Hoffman et al. 1991). Ebenfalls zu einer Hemmung der Aufnahme führt Kokain, während Amphetaminderivate nicht nur die Aufnahme hemmen, sondern sogar zu einem Efflux von Serotonin führen, indem sie den Austausch von einem Molekül Serotonin nach extrazellulär für ein Molekül des Medikamentes nach intrazellulär katalysieren (Rudnick & Wall 1992a, b). Anschließend wurden weitere Orthologe von Mensch, Maus und nicht-humanen Primaten kloniert (Lesch, Wolozin, et al. 1993, Ramamoorthy et al. 1993, Chang et al. 1996, Bengel, Heils, et al. 1997, Miller et al. 2001). Das *SERT*-Gen besteht aus 14 Exonen (Lesch et al. 1994), ist auf dem Chromosom 17q11.1-17q12 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit der Länge von 630 AS (Ramamoorthy et al. 1993). Die funktionelle Charakterisierung in HeLa-Zellen zeigte eine hochaffine, sättigbare, Na^+ - und Cl^- -abhängige Aufnahme von Serotonin (K_m -Wert=463 nM) (Ramamoorthy et al. 1993). Die mRNA-Expression von *SERT* ist bei Ratte, Maus und Mensch in Gehirngebieten mit serotonergen Neuronen dominant (Hoffman et al. 1991) und besitzt die höchste Expression in den *Nuclei raphe*s (Lesch, Aulakh, et al. 1993, McLaughlin et al. 1996, Chang et al. 1996, Bengel, Jöhren, et al. 1997). In der Peripherie wurde die spezifische mRNA im Magen, Dünndarm, chromaffinen Zellen der Nebenniere, Mastzellen in der Lunge und Makrophagen in der Milz nachgewiesen (Hoffman 1994). In immunhistologischen Untersuchungen am Gehirn der Ratte wurde die Proteinexpression von *rSert* in den *Nuclei raphe*s und in Regionen des basalen Vorderhirns, welche reich an serotonergen Innervationen sind, bestätigt (Qian et al. 1995). Die Regulation von SERT unterliegt einer posttranslationalen Modifizierung durch zahlreiche Kinasen und Phosphatasen, wobei die Aktivierung der Proteinkinase C zu einer schnellen Herabregulation

der SERT-vermittelten Serotoninaufnahme führt (Qian et al. 1997). Der SERT ist die Zielstruktur vieler therapeutisch verabreichter Medikamente, einschließlich trizyklischer Antidepressiva und selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, welche für die Behandlung von Depressionen, Zwangsstörungen, Schlaf- und Essstörungen verwendet werden (Schmid et al. 2001).

Sert-Knockout-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine auffallenden anatomischen Anomalitäten. In Studien an der *Sert*-Knockout-Maus wurde demonstriert, dass der *mSert* essentiell ist für die Serotoninhomöostase im Gehirn, und eine Inaktivierung zu einer konsequenten Erhöhung extrazellulärer Serotoninspiegel und verminderten intraneuronalen Konzentrationen im Gehirngewebe führt (Bengel et al. 1998, Mathews et al. 2004). Homozygote Mäuse reagieren nicht mehr sensitiv auf die Gabe des Amphetaminderivates Ecstasy (3,4-Methylenedioxyamphetamin), welche beim Wildtyp zu einer präsynaptischen Freisetzung von Serotonin und folglich zu einer Hyperaktivität führt (Bengel et al. 1998). Phänotypisch wurden mehr als 50 Veränderungen identifiziert, welche hier nur beispielhaft wiedergegeben werden (Murphy & Lesch 2008). Festgestellt wurden eine verringerte Aggressivität, erhöhte Ängstlichkeit, erhöhte Stressempfindlichkeit, verändertes antidepressives Verhalten und eine reduzierte Aktivität im Käfig (Holmes et al. 2002, Lira et al. 2003, Holmes, Yang, et al. 2003, Ansorge et al. 2004). Außerdem ähneln einige Verhaltensweisen der *Sert*-Knockout-Maus den Symptomen, die auch bei einem pharmakologisch induzierten klassischen Serotonin-Syndrom im Nagetier auftreten (Kalueff et al. 2007). Auch im enterischen Nervensystem wurde die gastrointestinale Funktion von *mSert* untersucht und herausgefunden, dass der Verlust von *mSert* zu einem Wechsel zwischen Diarrhoe und Obstipation und weiteren Symptomen führt, welche den Symptomen ähneln, die bei dem Irritablen Darmsyndrom/Reizdarmsyndrom des Menschen auftreten. Die Funktion von *mSert* wird vermutlich durch *mDat*, *mOct1* und *mOct3* teilweise kompensiert (Chen et al. 2001). Zusätzlich wurde die Entwicklung einer Adipositas ab einem Alter von ungefähr drei Monaten beobachtet und mit erhöhten Insulin- und Leptinplasmaspiegeln und einer Hyperglykämie assoziiert (Murphy & Lesch 2008).

1.11 Die *Organic Cation Transporter*

Die *Organic Cation Transporter* (OCT1-3) gehören zu der SLC22-Familie und sind elektrogene, bidirektionale Uniporter für organische Kationen. Sie sind gekennzeichnet durch ihre Multiselektivität, welche im Einklang steht mit ihrer hauptsächlichen Funktion der Ausscheidung einer großen Anzahl endogener und xenobiotischer Substanzen in Niere, Leber und Plazenta (Jonker & Schinkel 2004, Pelis & Wright 2014). Überraschend war deshalb die Entdeckung, dass die Transporter OCT2 und OCT3 auch im Gehirn eine

wichtige Funktion als kompensatorisches Transportsystem für Monoamine (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin) (Couroussé & Gautron 2014), Acetylcholin (Lips et al. 2005) und Cholin (Lee, Wolff, et al. 2009) darstellen. Dabei wird OCT2 sogar in synaptischen Vesikeln cholinergischer Neurone exprimiert (Nakata et al. 2013). Für die Aufnahme extrazellulärer Monoamine wurden zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben. Im Kontrast zu den hoch-affinen Neurotransmittertransportern der Nervenendigung (Noradrenalintransporter NET, SERT, DAT), welche auch als das *Uptake₁-System* bezeichnet werden, ist das *Uptake₂-System* Na⁺- und Cl⁻-unabhängig und besitzt eine geringe Affinität, aber eine hohe Kapazität für ihre jeweiligen Substrate (Couroussé & Gautron 2014). Da die pharmakologischen Profile der Subtypen OCT1-3 zu den generellen Charakteristika des *Uptake₂-Systems* passen, wurde eine Beteiligung an diesem vorgeschlagen (Wulfsch et al. 2009).

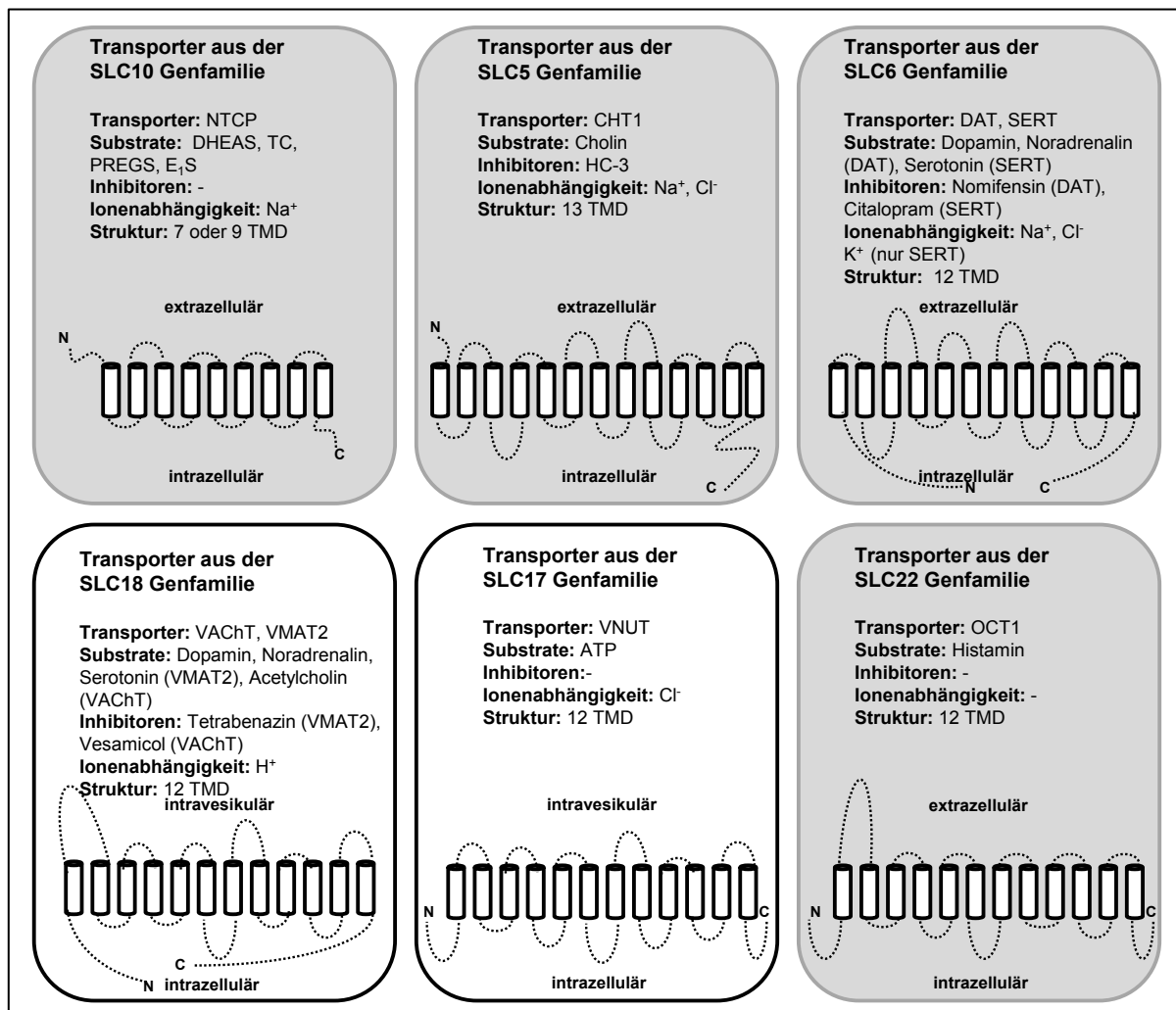


Abb. 1.4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Referenztransporter

Gezeigt wird eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit beschriebenen plasmamembranständigen (grau hinterlegt) und vesikulären (weiß hinterlegt) Transporter, ihrer Struktur und Ionenabhängigkeit und der verwendeten Substrate und Inhibitoren (Liu et al. 1992, Giros & Caron 1993, Erickson et al. 1994, Ferguson et al. 2003, Wright & Dantzer 2004, Gether et al. 2006, Sawada et al. 2008, Döring et al. 2012, Okuda et al. 2012).

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Das *orphan carrier* Protein rSlc10a4 wurde im Jahre 2004 als ein neues Mitglied der SLC10-Familie identifiziert. SLC10A4 besitzt die höchste phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität zu NTCP und eine zu den anderen Familienmitgliedern identische Membrantopologie aus sieben oder neun Transmembrandomänen, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. SLC10A4 ist in Synapsen cholinerg und monoaminerg Neurone des zentralen und peripheren Nervensystems lokalisiert. Aufgrund der Lokalisation und der Zugehörigkeit zu einer Transporterfamilie sollte in dieser Arbeit die Hypothese untersucht werden, ob es sich bei SLC10A4 um einen Transporter für Neurotransmitter oder deren Intermediate handelt. Das Ziel der Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des *orphan carrier* SLC10A4. Diese umfasste die Klonierung des SLC10A4-Proteins und der Positivkontrollen DAT, CHT1, SERT, VMAT2, VACHT und VNUT, die Generierung stabil und transient transfizierter HEK293 Zelllinien für subzelluläre Lokalisationsstudien und die Aufnahmemessungen mit radioaktiv-markierten Kandidatensubstraten in unterschiedlichen Expressionssystemen. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich ausführliche Transportstudien in *X. laevis* Oozyten durchgeführt.

Außerdem sollte die erworbene B6;129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus als ein weiteres Model auf der Suche nach der Funktion von SLC10A4 etabliert werden. Dazu gehörten die Zucht und Betreuung der Maus, der Nachweis der Deletion auf DNA-, RNA- und Proteinebene und die Rückkreuzung der B6;129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus auf den Hintergrund des C57BL/6 Inzuchtstammes als saubere Grundlage für alle zukünftig folgenden Versuche im Mausmodell.

2 Material

2.1 Molekularbiologisches Material

2.1.1 Primer

Klonierung in pcDNA5/FRT/V5-His TOPO und in pcDNA6.2/C-EmGFP/YFP TOPO Vektor	Sequenz 5' → 3'	T_m
P4-TA2-F (18 bp)	acc gac ggg cag aac gac	61,0 °C
P4-TA2-R-OS (21 bp)	gag aga agt ctg agc ggt ttc	61,0 °C
VAcHT-TA2-F (18 bp)	cgg aag agc atc ggg gtg	61,0 °C
VAcHT-TA2-R-OS (19 bp)	gct gcg ggt gta gta gta g	59,0 °C
VMAT2-TA-F (21 bp)	gcc atg gcc ctg agc gag ctg	69,0 °C
VMAT2-TA-OS-R (31 bp)	gtc act ttc aga ttc ttc atc ttc acc tat c	68,0 °C
DAT-TA-F (25 bp)	ctc cca gtg tgc cca tga gta aga g	69,0 °C
DAT-TA-OS-R (21 bp)	cac ctt gag cca gtg gcg gag	67,0 °C
CHT-TA-F (24 bp)	aaa aat ggc ttg cca tgt gga agg	62,0 °C
CHT-TA-R-OS (23 bp)	ctg taa att atc ttc agt ccc ag	59,0 °C
SERT-mit START-F (26 bp)	agg atg gag acg acg ccc ttg aat tc	69,0 °C
SERT-OS-R (25 bp)	cac agc att caa gcg gat gtc ccc a	69,0 °C

Subklonierung in pcDNA5/FRT/TO TOPO Vektor	Sequenz 5' → 3'	T_m
P4-TA2-F (18 bp)	acc gac ggg cag aac gac	61,0 °C
GFP-R (25 bp)	tta tca tta ctt gta cag ctc gtc c	63,0 °C
VAcHT-TA2-F (18 bp)	cgg aag agc atc ggg gtg	59,0 °C
GFP-R (25 bp)	tta tca tta ctt gta cag ctc gtc c	63,0 °C
VMAT2-TA-F (21 bp)	gcc atg gcc ctg agc gag ctg	69,0 °C
GFP-R (25 bp)	tta tca tta ctt gta cag ctc gtc c	63,0 °C
DAT-TA-F (25 bp)	ctc cca gtg tgc cca tga gta aga g	69,0 °C
GFP-R m.STOP II (33 bp)	taa act tat cat tac ttg tac agc tcg tcc atg	69,0 °C
CHT-TA-F (24 bp)	aaa aat ggc ttg cca tgt gga agg	62,0 °C
GFP-R (25 bp)	tta tca tta ctt gta cag ctc gtc c	63,0 °C

Sequenzierprimer	Sequenz 5' → 3'	T_m
CMV-F (21 bp)	cgc aaa tgg gcg gta ggc gtg	67,0 °C
BGH-R (18 bp)	tag aag gca cag tcg agg	56,0 °C
T7-F (23 bp)	taa tac gac tca cta cta tag gg	59,0 °C
FP2-R (21 bp)	tca cca tgt taa cag cat caa	55,0 °C

B6.129S5-Slc10a4^{tm1lex} Knockout-Maus	Sequenz 5'→3'	T_m
P4-Multi-F (20 bp)	taa aag gga cca cag gac cg	60,0 °C
WT-P4-Multi-R (21 bp)	caa agc caa gcc tcc ata tac	57,9 °C
KO-P4-Multi-R (21 bp) TIGM	ccc tag gaa tgc tcg tca aga	61,0 °C
r/m P4-R (22 bp)	cct ctc gct tgt gca gta tct c	64,0 °C
GAPDH-F1	cca cca ccc tgt tgc tgt ag	62,0 °C
GAPDH-R4	acg gga agc tca ctg gca tg	62,0 °C

Die Primer wurden von der Firma *Metabion* (Martinsried) oder *MWG Biotech* (Ebersberg) synthetisiert und auf eine Konzentration von 10 pmol/μl eingestellt.

2.1.2 cDNA-Klone

SLC10A4: humaner cDNA-Klon, NM_152679.2, SC123272	OriGene Technologies, Rockville
SLC5A7: humaner cDNA-Klon, NM_021815.2, SC112868	OriGene Technologies, Rockville
SLC18A3: humaner cDNA-Klon, NM_003055.1, SC122644	OriGene Technologies, Rockville
human brain cDNA, aus Multiple Tissue Panel 1	BD Clontech, Heidelberg

2.1.3 Restriktionsenzyme

FastDigest <i>KpnI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
FastDigest <i>SphI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Apal</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>BamHI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>EcoRI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>MluI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>SacII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>SmaI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>XbaI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
DNase I	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.4 Thermostabile DNA-Polymerasen

Expand High Fidelity Plus (Roche Applied Science, Mannheim)

- Mischung aus thermostabiler *Taq* DNA-Polymerase und thermostabiler *Tgo* Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*)
- sehr guter Ertrag und Genauigkeit, generiert A-Überhänge

Expand Long Template PCR-System (Roche Applied Science, Mannheim)

- Mischung aus thermostabiler *Taq* DNA-Polymerase und thermostabiler *Tgo* Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*)
- sehr guter Ertrag und Genauigkeit, generiert A-Überhänge
- optimiert für die Amplifikation sehr langer DNA Fragmente

Fast Start High Fidelity (Roche Applied Science, Mannheim)

- Mischung aus *FastStart Taq* DNA-Polymerase und einem thermostabilen Reparaturprotein für eine *Hotstart*-PCR
- hohe Genauigkeit, generiert A-Überhänge

GC-RICH PCR System (Roche Applied Science, Mannheim)

- Mischung aus *Taq* DNA-Polymerase und einer *proofreading* DNA-Polymerase
- für GC-reiche, repetitive Sequenzen, generiert z.T. A-Überhänge
- Zugabe von *GC-RICH Resolution Solution*

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

- Fehlerrate ist ca. 25-fach geringer als bei einer *Taq* Polymerase
- generiert *blunt ends*

Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

- generiert *blunt ends*
- kurze Elongationszeiten von 15 s/kb

Klenow-Fragment (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

- Proteinfragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*
- mit 5'→3'-Polymerase-Aktivität, 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proof reading*)
- ohne 5'→3'-Exonuklease-Aktivität

2.1.5 Quantitative *Real-Time PCR*

TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)

SLC10A4 Human	HS00293728
VACHT Human	HS00268179
VMAT2 Human	HS00161858
GAPDH Human	HS99999905

Komponenten: zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation
5'-FAM-markierte TaqMan MGB (Minor Groove Binder) Sonde mit 3'-Quencher

TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt)

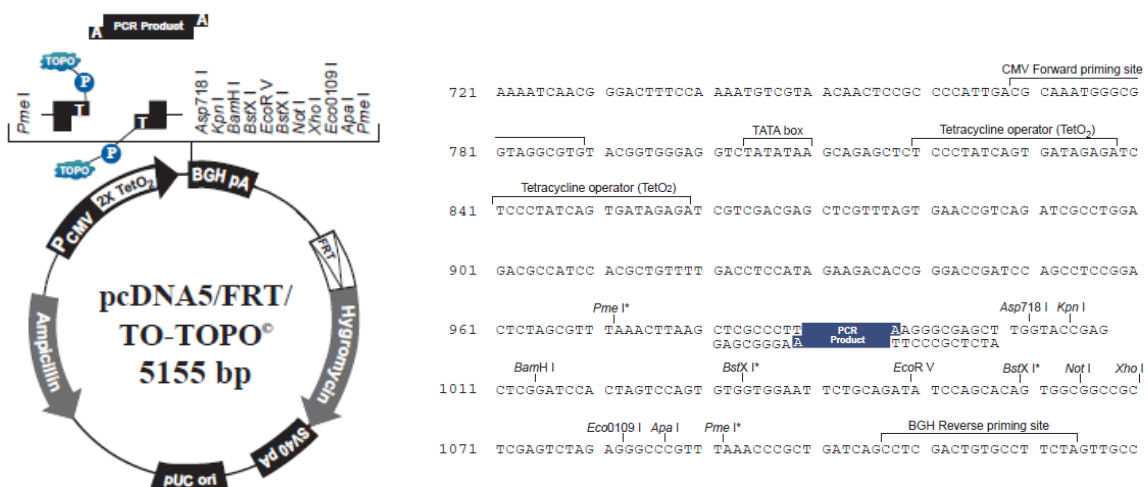
Der TaqMan Gene Expression Master Mix enthält eine AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5'→3'-Polymerase-Aktivität, 5'→3'-Exonuklease-Aktivität), optimierte Pufferkomponenten, eine Mischung aus dNTPs mit dTTP/dUTP und Uracil-DNA-Glycosylase und eine passive interne Referenz (ROX).

2.1.6 Vektoren

pcDNA-5/FRT/TO-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

5155 bp Gesamtlänge

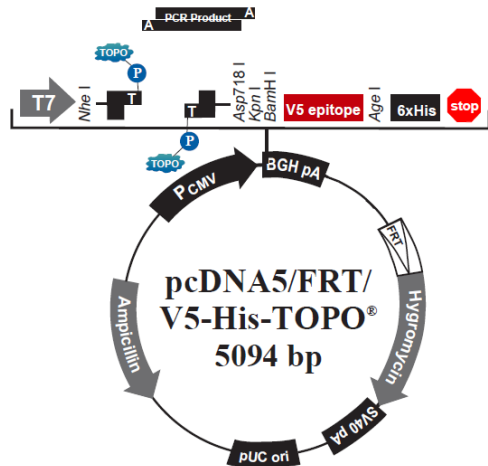
CMV-Promotor mit TATA-Box und 2x Tetracyclin-Operon (TetO₂), TOPO-Klonierungsstelle, BGH Poly A, FRT-site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Hyg^r, Amp^r



pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

5094 bp Gesamtänge

CMV-Promotor, T7-Promotor, TOPO-Klonierungsstelle, V5-Epitop, Polyhistidin

(6x His) Region, BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Hyg^r, Amp^r

CMV promoter

721 AAAATCAACG GGAATTTCCTTCA AATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG

CMV forward priming site TATA 3' end of CMV promoter putative transcriptional start

781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA

841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC

901 GTTTAAACTT AAGCTCGCCCTT PCR Product AAG GGC GAG CTT GGT ACC GAG CTC

Asp718 KpnI

947 GGA TCC GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT

BamHI V5 epitope

Gly Ser Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Thr Glu Leu

995 ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTT TAAACCCGCT

AgeI Polyhistidine (6xHis) region PmeI

Thr Arg Thr Gly His His His His His His ***

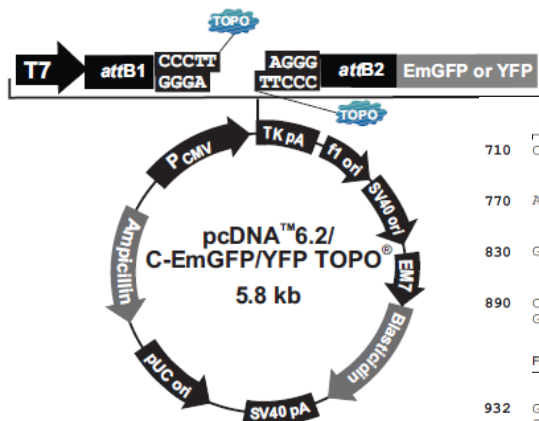
1041 GATCAGCCTC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTCGCC TCCTCCGCTGC

BGH reverse priming site

pcDNA6.2/C-EmGFP/YFP TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

5814 bp Gesamtlänge

CMV-Promotor, T7-Promotor, TOPO-Klonierungsstelle, attB2 site, EmGFP Epitop (Emerald Green Fluorescent Protein), TK PolyA, f1 origin, SV40 early promoter und origin, EM7 Promotor, SV40 PolyA, pUC origin (komplementärer Strang), *bla* Promotor (komplementärer Strang), Blasticidin^r, Amp^r (komplementärer Strang)



CAAT

710 CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT

TATA 3' end of CMV promoter putative transcriptional start

770 AGAGAACCCA CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA

T7 promoter/priming site

830 GCTGGCTAGT TAAGCTGAGC ATCAACAAGT TTGTACAAA AAGCAGGCTC CGAATTCGCC

attB1

890 CTT PCR Product AAG GGC GAA TTC GAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT

GAA PRODUCT TTC CCC CTT AAG CTG GGT CGA AAG AAC ATG TTT CAC CAA

Lys Gly Glu Phe Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val

FP 2 Rev priming site

932 GAT GCT GTT AAC ATG GTG AGC // --- TGA TAA GTT TAAACGGGG AGGCTAACTG

HpaI PmeI

CTA CGA CAA TTG EmGFP or YFP *** **

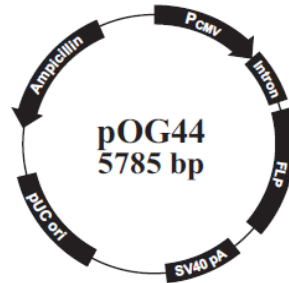
Asp Ala Val Asn --- --- ---

1693 AAACACGGAA GGAGACAA

pOG44 (Invitrogen, Karlsruhe)

5785 bp Gesamtlänge

CMV-Promotor, synthetisches Intron, Flp Recombinase, SV 40 Poly-A, pUC origin, *bla* Promotor, Amp^r

**2.1.7 Kommerziell erhältliches Material und Kits**

Hi Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit
dNTPs (je 10 mM)
NucleoBond Xtra Midi-Kit
QIAEX II Gel Extraction Kit
Qiaprep Spin Miniprep Kit
Wasser für die Molekularbiologie

Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
MBI Fermentas, St.Leon-Roth
Macherey Nagel, Düren
Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen GmbH, Hilden
Roth, Karlsruhe

Längenstandards für Agarosegelelektrophorese

1000 bp Gene Ruler DNA Ladder Mix
100 bp DNA Ladder H3 RTU
peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter

MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Genedirex, Taiwan, Taipei
Peqlab, Erlangen

Aufreinigung von Nukleinsäuren

DNeasy Blood & Tissue Kit
Roti-Phenol/Chloroform-Lösung

Qiagen GmbH, Hilden
Roth, Karlsruhe

DNA/RNA Transkriptasen

mMessage mMachine T7 Kit

Ambion, Life Technologies GmbH,
Darmstadt

Poly (A) Tailing Kit

Ambion, Life Technologies GmbH,
Darmstadt

MEGAclear Kit

Ambion, Life Technologies GmbH,
Darmstadt

RNA

Tri-Reagent	Sigma, Taufkirchen
RNAlater RNA Stabilization Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8 Bakterienstämme

TOP10 chemically competent cells (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: $F^-mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG \lambda$

2.1.9 Puffer und Medien für Bakterien

LB-Medium (1l) (Luria-Broth)	Trypton	10 g
	NaCl	10 g
	Yeast-Extract	5 g
	pH 7,0 (NaOH), autoklavieren	
	vor Verwendung Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin	
LB-Agar (1l)	LB-Medium	1l
	Agar-Agar	20 g
	autoklavieren und abkühlen auf ca. 60 °C	
	100 µg/ml Ampicillin zugeben und Platten gießen	
SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe)	Trypton	2 %
	Yeast-Extract	0,5 %
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM

2.2 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

6 x Loading Dye (MBI, Fermentas, St. Leon-Roth)	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Xylen Cyanol FF	0,03 %	
	Glycerin	60 %	
	EDTA	60 mM	
10 x TAE-Puffer (1l)	Tris Base	400 mM	48,4 g
	Essigsäure	200 mM	11,42 ml
	0,25 M EDTA, pH 8,0	10 mM	40 ml
	→ wurde als 1xTAE-Puffer verwendet		
GelRed (Biotium)	NaCl	1 M	100 ml
	H ₂ O		900 ml
	GelRed		300 µl
EB-Färbelösung	Ethidiumbromid in H ₂ O		1 µg/µl
1% Agarosegel	Agarose		1 g
	1 x TAE Puffer		100 ml
1,5% Agarosegel	Agarose		1,5 g
	1 x TAE Puffer		100 ml

2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

DEPC-ddH₂O (1l)	DEPC (1 mg/ml)	0,1 %	1 ml
	ddH ₂ O		1 l
	→ über Nacht inkubieren		
	→ autoklavieren		

10 x MOPS-Puffer (400 ml)	MOPS	200 mM	16,74 g
	Natriumacetat	100 mM	3,28 g
	20 mM EDTA	1 mM	20 ml
	DEPC-ddH ₂ O		380 ml
	→ pH 7,0 (NaOH)		
	→ lichtgeschützt lagern, als 1 x verwenden		
Agarosegel	Agarose		1 g
	DEPC-ddH ₂ O		40 ml
	10 x MOPS		5 ml
	→ kochen bis Agarose gelöst ist		
	Formaldehyd		7 ml
	→ zugeben und Gel gießen		
1,3 x Ladepuffer	Formamid	55 %	
Roti-Load RNA (Roth, Karlsruhe)	MOPS	22 mM	
	Natriumacetat	8,8 mM	
	EDTA	1 mM	
	Formaldehyd	6,8 %	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Ethidiumbromid	0,0005 %	
	→ pH 7,0		

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Flp-In T-REx HEK293-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

Wirtszelllinie:	<i>Human Embryonic Kidney cells</i> 293 (HEK 293) ATTC-Nummer CRL-1573
Modifikation:	stabil in das Genom integrierte <i>FRT site</i> (<i>Flp Recombinant Target site</i>) über das pFRT//acZeo Plasmid Konstitutive Expression eines Tet-Repressors über den pcDNA6/TR
Charakteristika:	adhärent wachsend Zeocin-Resistenz für die Selektion der integrierten <i>FRT site</i> Blasticidin-Resistenz für die Selektion des pcDNA6/TR

GripTite 293 MSR-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

Wirtszelllinie:	<i>Human Embryonic Kidney cells 293 (HEK 293-H)</i>
Modifikation:	Konstitutive Expression des <i>human macrophage scavenger receptor type 1 (MSR 1)</i> (pCMV SPORT6 MSR.neo) → sehr hohe Adhärenz
Charakteristika:	adhärent wachsend Geneticin-Resistenz für die Selektion des pCMV SPORT6 MSR.neo

2.3.2 Zellkulturmedien**Flp-In T-REx HEK293-Zellmedium (500 ml)**

D-MEM (high glucose)		217,5 ml
F-12 (Ham)		217,5 ml
FKS	10 %	50 ml
L-Glutamin (200 mM)	4 mM	10 ml
Pen/Strep (10000 Units/ml; 10000 µg/ml)	1 %	5 ml

GripTite 293 MSR-Zellmedium (500 ml)

D-MEM (high glucose)		430 ml
FKS	10 %	50 ml
<i>MEM Non-Essential Amino acids (NEAA)</i>	0,1 mM	5 ml
L-Glutamin (200 mM)	4 mM	10 ml
Pen/Strep (10.000 Units/ml; 10.000 µg/ml)	1 %	5 ml

HEPES-Puffer (1l)

HEPES	4,77 g	18 mM
NaCl	7,07 g	120 mM
KCl	0,4 g	5 mM
KH ₂ PO ₄	0,06 g	0,4 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,08 g	0,3 mM
Glukose	1 g	6 mM
Phenolrot	0,01 g	0,03 mM
EDTA	0,37 g	1 mM
→ pH 7,3 (HCl/NaOH)		

Trypsinlösung (100 ml)

Trypsin	0,025%	25 mg
HEPES-Puffer		100 ml

Einfriermedium

Normalmedium	90 %
DMSO	10 %

Beschichtungsmedium

Poly-D-Lysin	100 µg/ml
--------------	-----------

Trypanblau (100 ml)

Trypanblau	4 %	4 g
NaCl	0,9 %	0,9 g

2.3.3 Antibiotika

Antibiotika	Verwendung	Endkonzentration	Hersteller
Blasticidin S Hydrochlorid	Selektion auf pcDNA6/TR	15 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Geneticin Disulfat (G418)	Selektion auf pCMV SPORT6 MSR.neo	600 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B (50 mg/ml)	Selektion auf Insert	150 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin Hydrochlorid	Induktion der Proteinexpression	1 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
Zeocin	Selektion auf pFRT//lacZeo	100 µg/ml	InvivoGen, Toulouse Frankreich

2.4 Stabile und transiente Transfektion

2.4.1 Transfektionsmedien

Flp-In T-REx HEK293-Zellmedium ohne Antibiotikum (50 ml)

D-MEM (<i>high glucose</i>)		22 ml
F-12 (Ham)		22 ml
FKS	10 %	5 ml
L-Glutamin (200mM)	4 mM	1 ml

Flp-In T-REx HEK293-Zellmedium ohne Antibiotikum und ohne FKS (50 ml)

D-MEM (<i>high glucose</i>)		24,5 ml
F-12 (Ham)		24,5 ml
L-Glutamin (200mM)	4 mM	1 ml

GripTite 293 MSR-Zellmedium ohne Antibiotikum (50 ml)

D-MEM (<i>high glucose</i>)		43,5 ml
FKS	10 %	5 ml
<i>MEM Non-Essential</i>	0,1 mM	0,5 ml
<i>Amino acids (NEAA)</i>		
L-Glutamin (200mM)	4 mM	1 m

2.4.2 Transfektionsreagenzien

Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM Serum Reduced Medium	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.5 Transportmessungen an eukaryotischen Zellen

2.5.1 Puffer und Lösungen für Transportmessungen an eukaryotischen Zellen mit intakter Plasmamembran

Transportpuffer mit Natrium (1 l)

NaCl	142,9 mM	8,35 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
HEPES	20 mM	4,777 g
200 mM CaCl ₂ (0,294 g / 10 ml ddH ₂ O)	1,8 mM	9 ml
→ pH 7,4 (1 M KOH), lagern bei 4 °C		

Transportpuffer ohne Natrium (1 l)

Cholinchlorid	142,9 mM	19,95 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
HEPES	20 mM	4,777 g
200 mM CaCl ₂ (0,294 g / 10 ml ddH ₂ O)	1,8 mM	9 ml
→ pH 7,4 (1 M KOH), lagern bei 4 °C		

Transportpuffer mit Lithium (1 l)

LiCl	142,9 mM	6,058 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
HEPES	20 mM	4,777 g
200 mM CaCl ₂ (0,294 g / 10 ml ddH ₂ O)	1,8 mM	9 ml
→ pH 7,4 (1 M KOH), lagern bei 4°C		

Lysepuffer (1 l)

NaOH	1 N	40,01 g
SDS	0,1 %	1 g

2.5.2 Puffer und Lösungen für Transportmessungen an eukaryotischen Zellen mit permeabilisierter Plasmamembran

Permeabilisierungspuffer (100 ml)

Digitonin	15 μ M	1,844 mg
in 100 % Ethanol gelöst		
Kalium-Puffer		100 ml

Kalium-Puffer (1 l)

Kaliumhydrogentartrat	110 mM	20,699 g
Pipes	20 mM	6,048 g
Glukose	5 mM	0,990 g
Mg ²⁺ -ATP	5 mM	2,656 g
BSA	0,2 %	2 g
Ascorbinsäure	1 mM	176,12 mg
CaCl ₂	200 μ M	29,4 mg
Pargylin	10 μ M	1,597 mg

→ pH 6,8 (1 M KOH), lagern bei 4°C

Lysepuffer (1 l)

NaOH	1 N	40,01 g
SDS	0,1 %	1 g

2.5.3 Lösungen für Transportmessungen an enzymatisch vorbehandelten Zellen

Thrombin	1 U/ 10 μ l TP
----------	--------------------

2.5.4 Proteinbestimmung

Stammlösung für Proteinstandardreihe

BSA (bovines Serum Albumin, Cohn Fraktion V)	2 mg
Lysepuffer	1 ml

Lösung C (für 100 wells)

Na ₂ CO ₃	4 %	20 ml
CuSO ₄	1 %	0,8 ml
K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat	2 %	0,8 ml

Folin-Lösung (für 100 wells)

<i>Folin & Coicalteu's phenol reagent</i>	1 ml
ddH ₂ O	3 ml

2.6 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten**2.6.1 Versuchstiere**

Für die durchgeführten Experimente wurden weibliche *X. laevis* Frösche verwendet, die zu der Art der Krallenfrösche gehören. Die Tiere sind Wildfänge und werden von *Xenopus Express* (Frankreich) bezogen und im Tierstall der Tierphysiologie im Karl-Vogt Haus (MZVG) gehalten. Die durchzuführenden Tierversuche wurden unter der Tierversuchsanzeige mit der Kennzeichnung JLU_400 beantragt und genehmigt.

2.6.2 Puffer und Lösungen für die Kultivierung der *X. laevis* Oozyten**OR-2 Puffer Ca²⁺-freie Lösung (1 l)**

NaCl	82,5 mM	4,82 g
HEPES	5,0 mM	1,19 g
KCl	2,5 mM	0,186 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mM	0,2033 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,0 mM	0,178 g
pH 7,8 (KOH), autoklaviert		

Modifizierte Barth's Lösung (1l)

NaCl	88,0 mM	5,14 g
HEPES	15,0 mM	3,57 g
NaHCO ₃	2,4 mM	0,2 g
KCl	1,0 mM	0,0745 g
Ca (NO ₃) x 4 H ₂ O	0,3 mM	0,0708 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,41 mM	0,0603 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,82 mM	0,2g
pH 7,6 (NaOH), autoklaviert		
vor Gebrauch 0,1 % Gentamicin zugeben		

Kollagenase-Lösung

Kollagenase Typ D	4,0 mg
OR2-Puffer	10,0 ml

2.6.3 Puffer für die Transportmessungen an *X. laevis* Oozyten**Transportpuffer mit Natrium (1 l)**

NaCl	100 mM	5,84 g
HEPES	10 mM	2,385 g
KCl	2 mM	0,149 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 mM	0,147 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM	0,2033 g
pH 7,5 (1 M Tris)		

Transportpuffer ohne Natrium (1 l)

Cholinchlorid	100mM	13,96 g
HEPES	10mM	2,385 g
KCl	2mM	0,149 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1mM	0,147 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1mM	0,2033 g
pH 7,5 (1 M Tris)		

Lysepuffer (1 l)

SDS	10 %	10,0 g
-----	------	--------

2.7 Flüssigszintillation**Szinzillationsflüssigkeit**

Isopropanol	300 ml
Aqua bidest.	300 ml
Rotiszint eco plus	6000 ml

2.8 Immunfluoreszenz

2.8.1 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen

10 x PBS (1 l)

NaCl	1380 mM	80 g
KCl	27 mM	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	100 mM	26,8 g
KH ₂ PO ₄	18 mM	2,4 g
→ pH 7,4 (HCl), autoklavieren		
→ als 1x PBS verwenden		

2 % PFA (50 ml)

PFA	2 %	1 g
mit ddH ₂ O auf 50-60°C erwärmen		45 ml
10 x PBS		5 ml
→ 1-2 Tropfen NaOH zugeben und bei 50°C lösen		
→ pH 6,8-7,2 (HCl)		

Puffer A (110 ml)

Glycin	20 mM	165,22 mg
1 x PBS		110 ml

Puffer B (70 ml)

BSA	1 %	700 mg
Puffer A		70 ml

Blockierlösung (70 ml)

Serum der Spezies	4 %	2,8 ml
in welcher der 2. AK hergestellt wurde		
Puffer B		67,2 ml

DAPI/Methanol (1:5000)

DAPI (1 mg/ml in ddH ₂ O)	50 µl
Methanol	250 ml

Eindeckelmedium

ProLong Gold Antifade, bei RT auftauen,
ca. 10 µl pro Deckgläschen auftragen, für ca. 24 h bei RT trocknen und
anschließend bei 4°C lagern

2.8.2 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an histologischen Organpräparaten**0,1 M Phosphatpuffer (2 l)**

Stocklösung A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,2 M	720 ml
Stocklösung B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 M	280 ml
ddH ₂ O		1 l
pH 7,4		

Blockierlösung (10 ml)

0,1 M Phosphatpuffer		9 ml
Ziegen- oder Pferdeserum	10 %	1 ml
Triton X-100	0,3 %	30 µl

Antikörperlösung (10 ml)

0,1 M Phosphatpuffer		9,8 ml
Ziegen- oder Pferdeserum	2 %	200 µl
Triton X-100	0,1 %	10 µl

PFA 4 % (100 ml)

0,1 M Phosphatpuffer (50-60 °C)		100 ml
Paraformaldehyd (PFA)	4 %	4,0 g
pH 7,4, auf 4°C abkühlen		

Sucroslösung (100 ml)

0,1 M Phosphatpuffer		100 ml
Sucrose	20 %	20 g

DAPI/PBS (300 ml)

1 x PBS		300 ml
DAPI (2 mg/ml in ddH ₂ O)	1:5000	30 µl

Eindeckelmedium (siehe 2.8.1)

DAKO Pen

DAKO Cytomation, Hamburg

2.9 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Anti-Slc10a4	VGTDLDVLMETTQTSL (C-Terminus, Ratte)	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (<i>custom antibody</i>)
Anti-V5	GKPIPNPLLGLDST	Monoklonal, Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Sekundärantikörper			
Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen IgG Cy-3 konjugiert	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Esel	Dianova, Hamburg
Fluoreszenzfarbstoff			
DAPI	Färbung von Zellkernen		Roche Diagnostics, Mannheim

2.10 Die B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

2.10.1 Tierversuchsanzeige

Die Generierung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus wurde vom Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM) durchgeführt. Alle weiteren tierexperimentellen Arbeiten erfolgten unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes und wurden bei dem Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen V 54-19 c 20/15 GI 18/11 Nr. A 38/2008 angezeigt und unter der Kurzbezeichnung 547_M gemeldet.

2.10.2 Mausstämme

Die offizielle Nomenklatur der verwendeten transgenen Maus lautet B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} da sie eine Chimäre der beiden Inzuchtstämme *C57BL/6* und *129S5SvEvBrd* darstellt. Für die Rückkreuzung wurden Mäuse des Inzuchtstammes *C57BL/6 NTac* von Taconic (Europe) zugekauft.

2.10.3 Puffer für die „schnelle“ Isolierung genomischer DNA

Alkalischer Lyse-Puffer	NaOH	25 mM
	EDTA	0,2 mM
	pH 12	
Neutralisationspuffer	Tris-HCl	40 mM
	pH 5	

2.11 Chemische Substanzen

2.11.1 Reagenzien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA Bovines Serum Albumin Fraktion V	Roche, Mannheim
BSA, Cohn Fraktion V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid Hexahydrat, $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat Tetrahydrat, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI, 4',6 - Diamidin-2-Phenylindol	Roche, Mannheim
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
D-MEM, Dulbecco's modified eagle's medium	Gibco, Karlsruhe
DMSO, Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure- Na_2	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (>99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	Gibco, Karlsruhe
FKS, fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Folin & Ciocalteu's phenol Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GelRed	Biotium, Hayward, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe

Immersions liquid Typ N (Öl für Mikroskopie)	Leica, Wetzlar
Isopropanol, C ₃ H ₈ O	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogentartrat, C ₄ H ₅ KO ₆	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ D	SERVA, Heidelberg
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe
Lithiumchlorid, LiCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
MEM Non Essential Amino acids (NEAA)	PAA, Cölbe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl für Molekularbiologie	Sigma, Steinheim
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
MOPS, 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid	Sigma, Steinheim
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml; 10.000 µg/ml)	Gibco, Karlsruhe
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PIPES, 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ProLong Gold	Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Load RNA 1,3 x Ladepuffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform Lösung	Roth, Karlsruhe
Rotiszint eco plus Szintillatoröl	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, HCl	Roth, Karlsruhe

SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
SDS, Sodium Dodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig, N ₂	Messer, Griesheim
Sucrose	Sigma, Steinheim
Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek Europe
	B.V., Leiden, Niederlande
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tryptone Peptone	Roth, Karlsruhe
Xylen Cyanol FF	Sigma, Steinheim
Ziegenserum	DAKO Cytom., Hamburg

2.11.2 Feinchemikalien

Acetylcholin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aspartat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citalopram	Biotrend, Zürich, Schweiz
Desipramin	Biotrend, Zürich, Schweiz
DHEAS, Dehydroepiandrosteron-3-sulfat	Sigma, Steinheim
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dopamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
E ₁ S, Estron-3-sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCCP, Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GABA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hemicholinium-3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Histamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lithocholat	Sigma, Steinheim
Mg ²⁺ -Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nomifensin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Noradrenalin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pargylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraoxon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PREGS, Pregnenolon-3-sulfat	Sigma-RBI, Steinheim
Serotonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taurocholat	Sigma, Steinheim
Tetrabenazin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Thrombin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vesamicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.11.3 Radioaktive Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität (Ci/mmol)	Konzentration (μ M)	mCi/ml	fmol/dpm
[³ H]Acetat ^a	0,15	33.333,33	5	3,03033
[³ H]Acetylcholin ^b	85,0	11,8	1	0,0053476
[³ H]Aspartat ^b	11,3	88,5	1	0,040225
[³ H]Adenosintriphosphat (ATP) ^b	30,9	32,4	1	0,01471
[³⁵ S]Adenosin 5'-(γ -thio)-triphosphat (γ -S-ATP) ^b	1250,0	10,0	12,5	0,00036364
[³ H]Cholin ^b	66,7	15,0	1	0,006815
[³ H]Dehydroepiandrosteron-3-sulfat (DHEAS) ^b	60,0	16,7	1	0,0075758
[³ H]Dihydroxyphenylethylamin (Dopamin) ^b	42,0	23,8	1	0,010823
[³ H]Estron-3-sulfat (E ₁ S) ^b	57,3	17,5	1	0,0079328
[³ H] γ -Aminobuttersäure (GABA) ^b	76,2	13,1	1	0,005965
[³ H]Glutamat ^b	49,6	20,2	1	0,0091643
[³ H]Histamin ^b	13,4	74,6	1	0,0339216
[³ H]Lithocholat ^a	50,0	10,0	1	0,0090910
[³ H]Noradrenalin ^b	56,6	17,7	1	0,00803
[³ H]Pregnenolon-3-sulfat (PREGS) ^a	20,0	50,0	1	0,0227275
[³ H]Hydroxytryptamin Kreatininsulfat (Serotonin) ^b	28,3	35,4	1	0,01609
[³ H]Taurocholat ^b	3,5	285,7	1	0,1298714

Hersteller: ^a ARC, St.Louis, MO, USA; ^b Perkin Elmer, Boston, MA, USA

2.12 Geräte

7300 Real-Time PCR System

Applied Biosystems, Darmstadt

Analysewaagen:

AE 260 Delta Range

Mettler-Toledo, Gießen

C-30 Microbalance

Cahn Instruments, Cerritos, CA,
USA

PG802-S

Mettler-Toledo, Gießen

Precisa 3000C-6000D

DAK-Oerlikon, Zürich, Schweiz

Autoklav Sanoclav

Wolf, Geislingen

Autoklav Systec 3150 EL

Systec, Wettenberg

Benchmark Microplate Reader

Bio-Rad, München

BioPhotometer

Eppendorf, Hamburg

Brutschrank

Heraeus, Hanau

CO₂-Inkubatoren

New Brunswick Scientific, Edison,
N.J., USA

Panasonic, Niederlande

Nuaire, Plymouth, MN, USA

Divac 2.4L Vakuumpumpe

Leybold, Köln

Electrophoresis Power Supply EPS600

Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, UK

Elektrophoresekammern

Werkstatt MZI, Gießen

14,5 x 6,5 cm

35,5 x 11,0 cm

Flüssigkeitsszintillationszähler:

Wallac 1409

Pharmacia, Freiburg

Tri-Carb 2900 TR

PerkinElmer, Weiterstadt

Tri-Carb 2910 TR

PerkinElmer, Weiterstadt

Fluoreszenz Mikroskop DM6000B

Leica, Wetzlar

S/W Kamera DFC350FX

Software FW 4000 V1.2 Fluorescence Workstation

mit Deblur V2.3.2 Deconvolution und 3D Reconstruction

Fluoreszenz Mikroskop DM5500B

Leica, Wetzlar

Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution

S/W Kamera DFC340FX

Filter A4 UV

(Ex: BP 360/40, BS: 400, Em: BP 470/40)

Filter L5

(Ex: BP 480/40, BS: 505, Em: BP 527/30)

Filter Y3

(Ex: BP 545/30, BS: 565, Em: BP 610/75)

Objektiv N PLAN 5x/0.12

Objektiv HCX PL FL 10x/0.25 PH1

Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70

Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0.11-0.23

G24 Environmental Incubator shaker

New Brunswick Scientific, Edison,
N.J., USA

Gelschlitten

Werkstatt MZI, Gießen

12 x 18 cm

7,5 x 5 cm

HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter

Hanna Instruments, Kehl am
Rhein

Image Master VDS

Amersham Pharmacia Biotech,
Buckinghamshire, UK

Kapillarenpuller

Werkstatt MZI, Gießen

Kryostat HM 500 O

Microm, Walldorf

Kryo-Thermostat WK5

Colora Meßtechnik, Lorch/Württ.

Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL 6

Heraeus, Hanau

Laminar Flow, DanLAF VFR 1806

Claus Damm, Fredensborg DK

Laminar Flow, NU-437-500-E

Nuaire, Plymouth, MN, USA

LED Lampen KL1600

Leica, Wetzlar

Magnetrührer IKAMAG RCR

Janke und Kunkel, Staufen

Mikroinjektionssystem Nanoliter 2000

World Precision Instruments,
Sarasota, USA

Mikromanipulator

Bachofer, Reutlingen

Mikroskop Fluovert

Leica, Wetzlar

Mikroskop M3Z

Wild, Heerbrugg

Mikroskop MZ6

Leica, Wetzlar

Mikrowelle plus

Siemens, München

MJ Mini Personal Cycler

Bio-Rad, München

MyTemp mini digital incubator

Benchmark, Edison, USA

Neubauer Zählkammer

Roth, Karlsruhe

Operationsbesteck	diverse
Perkin Elmer Gene Amp Cyclor Typ 2400	PerkinElmer, Weiterstadt
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	Gilson, Middleton, USA
	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Power Pac 200 Spannungsgeber	Bio-Rad, München
Spannungsgeber (0-200 mA, 1kV, 150 W)	Werkstatt MZI, Gießen
Taumler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler Primus 96 advanced gradient	PeqLab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Titramax 100	Heidolph, Schwabach
Ultra-Turrax-Homogenisator T25	IKA, Staufen
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wärmeplatte	LKB, Bromma, Schweden
Wärmeplatte	Werkstatt BFS, Gießen
Wärmeschränk	Melag, Berlin
Wasserbad	Memmert, Schwalbach
Wasserbad SW21	Julabo, Seelbach
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge 5471 R	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Sorvall Kühlzentrifuge RC5C mit Rotor HB4	Du Pont, Bad Homburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge Speed Vac SC 110	Savant, Farmingdale, USA

2.13 Verbrauchsmaterial

12,5 cm ² Kulturschalen	Becton Dickinson Falcon, Le Pont De Caix, France
6-well Platten	Greiner bio one, Frickenhausen
24-well Platten	Greiner bio one, Frickenhausen
25 cm ² Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
48-well Platten	Greiner bio one, Frickenhausen
75 cm ² Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht

96-well ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
CryoPure Gefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen, Ø 12 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegskalpell	megro, Wesel
Glaskapillaren	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Klonierringe	Werkstatt MZI, Gießen
MicroAmp Optical 96 well Reaction plate	Applied Biosystems, Singapur
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Plastik	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau
Pasteurpipetten Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
PCR-tubes, 0,2 ml	ABgene, Epsom, UK
Petrischalen	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pony Vial H/I (Minivial)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
RNaseZap Wipes	Applied Biosystems, Darmstadt
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Schraubdeckelgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Sterilfilter 0,22 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipetten/Liquipetten	Sarstedt, Nümbrecht
UVetten	Eppendorf, Hamburg

2.14 Verbrauchsmaterial im Tierstall

Käfigeinstreu, autoklavierte Späne (WH-Grade 6)	LasVendi, Soest
Haltungsfutter Altromin1324TPF	Altromin, Lage
Typ II L Makrolon-Käfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Typ GM 500 Käfige mit statischer Filterhaube	Tecniplast, Hohenpeißenberg

2.15 Bioinformatische Programme und Datenbanken

BLAST, NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Vergleich von Sequenzen gegen
Datenbank

Boxshade 3.21

www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Visualisierung von Sequenzalignements

ClustalW

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Sequenzalignements

DNASTar Version 8.0.2, Lasergene, Madison, USA

EditSeq

Bearbeitung von Sequenzen

MegAlign

Sequenzvergleich und Alignements

MapDraw

Ermitteln von Schnittstellen

Double Digest Finder, NEB

www.neb.com/tools

Ermitteln der Bedingungen für

Restriktion mit zwei Enzymen

DoubleDigest

www.fermentas.com/doubledigest/index.html

Ermitteln der Bedingungen für

Restriktion mit zwei Enzymen

EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute

www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html

Datenbankportal Europa

EXPASY Peptide Cutter

http://web.expasy.org/peptide_cutter/

Ermitteln von Schnittstellen

FinchTV (Geospiza)

www.geospiza.com/finchtv/

Auswertung von Sequenzspuren

GraphPad Prism 4, San Diego, CA, USA

www.graphpad.com/prism/pdemo.htm

Berechnung und Darstellung von

Graphiken, statistische Auswertung

NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/

Datenbankportal des National Center
for Biotechnology Information, USA
(Literaturrecherche, Sequenzsuche)

Oligo 4.0 (Wojciech Rychlik, Oslo, Norwegen)

Primerauswahl

SLC Tables

www.bioparadigms.org/slc/intro.asp

Übersicht über alle Mitglieder der
SLC10-Familie

Spectra Viewer

www.probes.invitrogen.com

Darstellung von Anregungs- und
Emissionsspektren von Fluorophoren

Tierbase

Datenbank zur Erfassung der Zucht und
Haltung von Versuchstieren sowie der
Dokumentation von Tierexperimenten

TreeView 1.6.6

taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html

Darstellung von

Verwandtschaftsdiagrammen

3 Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion proteinhaltiger Lösungen

Um DNA und RNA aus proteinhaltigen Lösungen zu extrahieren, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dafür wurde die proteinhaltige Lösung mit ddH₂O auf ein Volumen von 100 µl verdünnt und mit dem gleichen Volumen *Roti-Phenol/Chloroform-Lösung* (Roth) 30 Sekunden lang in kurzen Pulsen gevortext. Die Auftrennung in drei Phasen erfolgte durch Zentrifugation (16.100 g, 2 min). Die obere, wässrige Phase enthielt die DNA oder RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die Interphase und die untere organische Phase wurden verworfen. Die Aufreinigung wurde noch ein weiteres Mal durchgeführt und die Nukleinsäuren, wie in 3.1.2 beschrieben, präzipitiert.

3.1.2 Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol

Für die Fällung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) aus einer wässrigen Lösung wurden 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und das 2,5-fache Volumen 100 %-iges Ethanol hinzu pipettiert. Die Lösung wurde durch mehrmaliges Schwenken gut durchmischt und im Anschluß gekühlt (RNA: -80°C, 2 h; DNA: -20°C, 30 min). Die Präzipitate bildeten sich durch Zentrifugation für 30 min bei 16.100 g. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet durch Zugabe von 250 µl eiskaltem Ethanol (70 %) und Zentrifugation (15 min) gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet unter Vakuum in einer Zentrifuge (SpeedVac) getrocknet. Danach wurde das Pellet in ddH₂O oder TE-Puffer gelöst und gelagert (RNA: -80°C, DNA: -20°C).

3.1.3 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden dazu verwendet, um doppelsträngige DNA an bekannten Zielsequenzen zu schneiden. Diese Methode wurde zur Orientierungskontrolle bei TA-Klonierung und Linearisierung von Plasmid-DNA, in Vorbereitung zur cRNA-Synthese verwendet. Das Schneiden der DNA wurde gemäß den Angaben der Enzymhersteller mit verschiedenen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt. Um 1 µg Plasmid-DNA zu schneiden, wurden für einen 50 µl Ansatz 5-10 Units des entsprechenden Restriktionsenzym und 5 µl des entsprechenden 10 x Puffers verwendet. Anschließend

erfolgte die Inkubation bei 37°C für 1-2 h. Wenn zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme in einem Ansatz verwendet werden sollten, wurden die Temperatur- und Pufferbedingungen mit den Programmen *Double Digest Finder* (NEB) oder *Double Digest* (Fermentas) ermittelt. Es wurden auch *FastDigest Restriktionsenzyme* (Fermentas) benutzt, welche die Inkubationszeit auf ungefähr 30 min verkürzten. Ein Aliquot des Restriktionsansatzes wurde anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

3.1.4 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Für die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *Qiaex II Gel Extraction Kit* (Qiagen) verwendet. Für eine bessere Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein präparatives 0,8% iges Agarosegel verwendet. Das Agarosegel wurde für ca. 5-10 min in Ethidiumbromid oder *GelRed* (Biotium) gefärbt und auf einem UV-Transilluminator begutachtet. Dann wurde die DNA-Bande der gewünschten Größe lokalisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die vorgewogenen Reaktionsgefäße wurden mit den präparierten Agarosestückchen befüllt und dann je nach Gewicht mit dem entsprechenden Volumen QX1 Puffer (300 µl QX1 Puffer/100 mg Agarosegel) und 10 µl resuspendierter *Qiaex II* Suspension versetzt. Für DNA-Fragmente, die größer waren als 4000 bp, wurden zusätzlich 2 Volumen ddH₂O hinzugefügt. Die Mischung wurde im Wasserbad erhitzt (50°C, 10 min) und alle 2 min gevortext, um die Agarose zu lösen und die *Qiaex II* Kügelchen in Suspension zu halten. Die Probe wurde dann zentrifugiert (16.100 g, 30 s) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zuerst mit 500 µl QX1 Puffer gewaschen, zentrifugiert (16.100 g, 30 s) der Überstand verworfen. Dies wurde mit 500 µl PE Puffer wiederholt. Danach wurde das Pellet an der Luft getrocknet bis es sich weißlich verfärbte und die DNA schließlich in 25 µl 10 mM Tris-HCl (pH-Wert 8,0) bei Raumtemperatur eluiert. Nach einer letzten Zentrifugation (16.100 g, 30 s) befand sich die DNA im Überstand und konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese wurde die aufgereinigte DNA kontrolliert.

3.1.5 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem *Hi Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit* (Süd-Laborbedarf GmbH) nach folgendem Protokoll durchgeführt. Das PCR-Amplifikat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit einem 5-fachen Volumen des DF Puffers durch Vortexen gemischt. Die Mischung wurde dann auf eine DF Säule gegeben und zentrifugiert (16.100 g, 30 s). Die Membran der Säule wurde mit 600 µl Waschpuffer eine Minute inkubiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss

verworfen und die Säule durch Zentrifugation (16.100 g, 3 min) getrocknet. Die Lösung der PCR-Produkte aus der Säulenmatrix erfolgte durch Inkubation (2 min) mit 15-50 µl Elutionspuffer und einer letzten Zentrifugation (16.100 g, 2 min) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß.

3.1.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Für die Konzentrationsmessung von DNA oder RNA wurde die zu messende Lösung mit ddH₂O verdünnt und in eine Küvette pipettiert. Dann wurde in einem Photometer (Eppendorf) die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt. Die Konzentration wurde aus folgender Formel errechnet:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{OD}_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

E = Extinktionskoeffizient (E_{DNA} = 50 µg; E_{RNA} = 40 µg)

Durch die zusätzliche Messung der optischen Dichte bei 280 nm konnten Rückschlüsse auf die Reinheit der gemessenen Probe gezogen werden. Der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für DNA zwischen 1,7 und 2,0 und für RNA über 1,8 sein.

3.2 Agarose-Gelelektrophorese

3.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die native Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten verwendet. Durch die Siebstruktur der Agarose wanderten große DNA-Fragmente in einem Stromfeld langsamer als kleine Fragmente. Um eine gute Auftrennung im Bereich von 500-7.000 bp zu erreichen, wurden größtenteils 1%-ige Gele hergestellt. Dafür wurde 1 g Agarose abgewogen und in 100 ml 1 x TAE-Puffer (Laufpuffer) in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Hatten sich alle Bestandteile gelöst, ließ man die Agarose auf dem Magnetrührer bis ca. 60°C abkühlen, um sie dann in die Gelschlitten zu gießen. Die Probestaschen wurden durch Kämme mit unterschiedlicher Anzahl an Zinken geformt. Das erstarrte Gel wurde in die mit 1 x TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, die DNA-Proben mit 6 x *Loading Dye* (MBI Fermentas) gemischt und in die Probestaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10 V/cm, bis der Farbstoff Bromphenolblau 2/3 der Gellänge durchwandert hatte. Anschließend wurden die Gele in *GelRed* (Biotium) oder

Ethidiumbromid für 30 min gefärbt und auf dem *Image Master* (Pharmacia Biotech) fotografiert. Für die Multiplex-PCR der Genotypisierung wurden 1,5 %-ige Gele verwendet, da hier DNA-Fragmente im Bereich von 300–1.000 bp zu erwarten waren. Zur Größenbestimmung wurde stets ein Längenstandard mitgeführt.

3.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Da RNA eine hohe Empfindlichkeit gegenüber ubiquitär vorhandenen RNasen aufweist und zusätzlich in nativen Gelen Sekundärstrukturen bildet, wird ihre Qualität auf einem denaturierenden Gel beurteilt. Dafür wurde 1 g Agarose mit 40 ml DEPC-ddH₂O und 5 ml 10 x MOPS-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Danach wurden unter einem Abzug 7 ml Formaldehyd dazu gegeben und das Gel in die Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es in die mit 10 x MOPS-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Es wurde jeweils 1 µg RNA mit 1,3 x *Roti-Load RNA* (Roth) versetzt, denaturiert (68°C, 10 min), auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zum Größenvergleich wurden 3 µl des Längenstandards *peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter* (Pqlab) mit 6 µl *Roti-Load RNA* (Roth) gemischt und in eine der äußeren Geltaschen aufgetragen. Der Vorlauf des Gels erfolgte bei 30 mA für ca. 15 min. Danach erfolgte die Auftrennung der RNA bei 60 mA. Nach Färbung mit *GelRed* konnte das Gel unter dem *Image Master* beurteilt und fotografiert werden. Degradierete RNA zeigte sich als Schmier auf dem Gel. Das Gelbild einer reinen, intakten RNA zeigte eine Bande bei ca. 1.800 bp (18S-rRNA) und eine bei ca. 5.000 bp (24S-rRNA).

3.3 Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR - *Polymerase chain reaction*) ermöglicht die Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments. Diese Methode wurde erstmals im Jahr 1987 (Mullis & Faloona 1987) vorgestellt. Dabei wird der Bereich zwischen zwei spezifischen Oligonukleotiden, den Primern, durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase in sich wiederholenden Zyklen amplifiziert (Abb. 3.1). PCR-Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte und für die Klonierung eingesetzt.

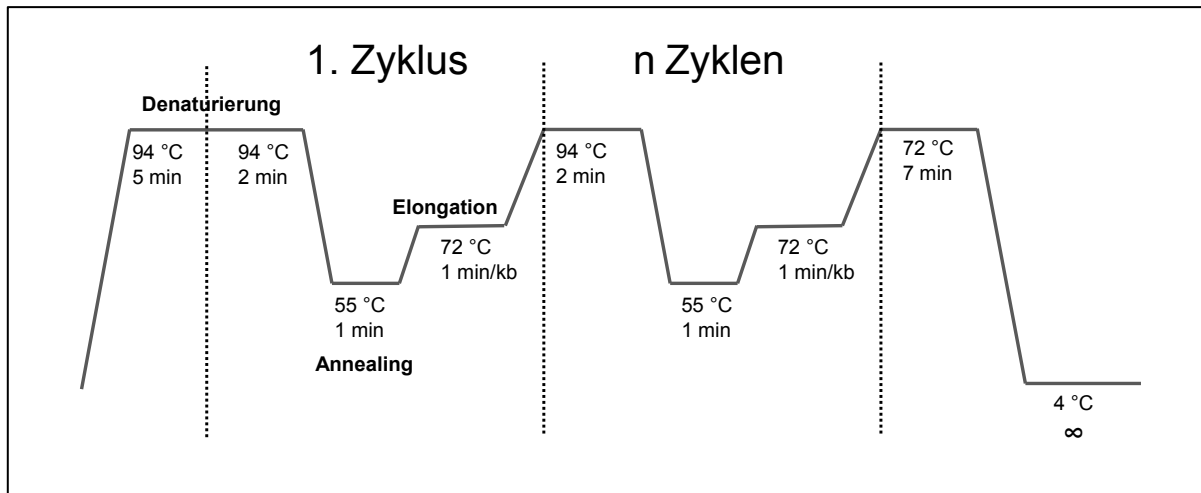


Abb. 3.1: Temperatur- und Zeitverlauf einer Standard-PCR

Die initiale Denaturierung erfolgt bei 94 °C über 5 min. Dabei trennt sich die doppelsträngige DNA auf und die Primer können sich an die Einzelstränge der Matrizen-DNA anlagern (Annealing). Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und liegt meistens 5-10 °C niedriger. Im folgenden Schritt steigt die Temperatur wieder auf 72 °C und die DNA-abhängige DNA-Polymerase verlängert den DNA-Strang von den Primern startend (Elongation). Dieser Zyklus wird 20 bis 40-mal wiederholt und endet in einer finalen Elongation bei 72 °C über 7 min.

3.3.1 Primer Auswahl

Die Auswahl der Primer wurde mit Hilfe des Programmes *Oligo 4.0* durchgeführt. Dabei wurden soweit möglich die folgenden grundsätzlichen Regeln beachtet. Die Länge der Primer betrug 18-30 Basenpaare (bp). Eine ausbalancierte Verteilung der unterschiedlichen Basen wurde bevorzugt, d.h. der GC-Gehalt sollte bei 50-60 % liegen. Um eine Leserasterverschiebung zu vermeiden, sollten in der Primersequenz nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander liegen. Der T_m -Wert ist die Temperatur, bei der 50 % der Primer nicht mehr an das Ausgangstemplate binden. Er sollte zwischen 55-80 °C liegen und wurde mit Hilfe eines Berechnungsprogrammes bei der Primersynthese von *Metabion* (Martinsried, Deutschland) berechnet. Des Weiteren wurden Vorwärts- und Rückwärtsprimer so ausgewählt, dass sie einen ähnlichen T_m -Wert aufweisen. Um die Spezifität der Primersequenz zu überprüfen, wurde über *NCBI BLAST* nach Sequenzhomologen gesucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer an ihren 3'-Enden eine geringe Komplementarität zeigen, da sie sonst leicht miteinander hybridisieren und Primerdimere bilden. Für eine bessere Bindung und Elongation wurden die Primer so designt, dass sich am 3'-Ende ein einzelnes G oder C befindet. Um Sekundärstrukturen zu vermeiden, sollte ΔG für eine Loopbildung > 0 sein.

3.3.2 Touchdown-PCR

Die Variante der Touchdown-PCR wurde bei vielen PCR-Protokollen verwendet, wie zum Beispiel bei der Klonierungs-PCR oder Reverse Transkriptase-PCR. Sie kombiniert die Vorteile einer hohen Spezifität durch hohe Annealingtemperaturen in den ersten Zyklen mit einer größeren Ausbeute an amplifizierter DNA durch anschließende Anlagerung der Primer bei niedrigeren Annealingtemperaturen. Die Annealingtemperaturen der ersten Zyklen wurden relativ nahe am T_m -Wert der Primer gewählt ($T_m - 2^\circ\text{C}$), wobei sich die Temperatur pro Zyklus um $0,5^\circ\text{C}$ verringerte. Nach 10 Zyklen war eine Annealingtemperatur von $T_m - 7^\circ\text{C}$ erreicht, bei welcher die folgenden 20-30 Zyklen fortgesetzt wurden. Um den Aktivitätsverlust der Polymerase durch die wiederholten Denaturierungsschritte auszugleichen, wurde die Elongationszeit in den letzten Zyklen um jeweils 5 s pro Zyklus verlängert.

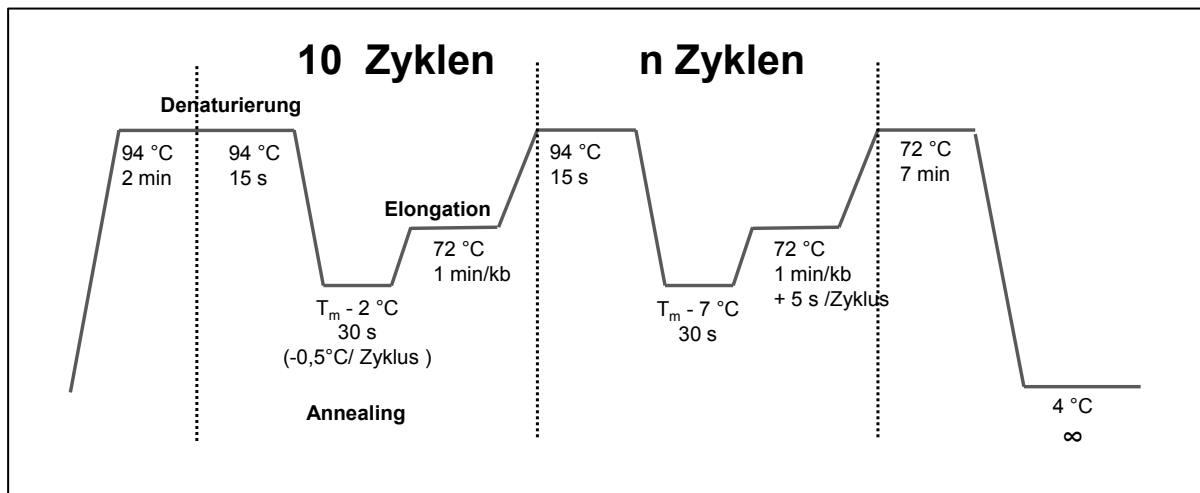


Abb. 3.2: Temperatur- und Zeitverlauf einer Touchdown-PCR

Die Annealingtemperatur wurde ausgehend vom T_m -Wert der Primer für jede PCR-Reaktion individuell eingestellt.

3.3.3 Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist eine Modifikation der PCR, bei der mehrere Primer in einem einzigen Ansatz verwendet wurden. Anstatt jeweils eine PCR für jeden Locus durchzuführen, wurden aus einer Template-DNA verschiedene Amplifikate gleichzeitig in einer PCR-Reaktion generiert. Diese Methode wurde speziell für die Genotypisierung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus etabliert, da dies eine Zeit- und Kostenersparnis ermöglichte. Die Herausforderung dieser Methode bestand in einem optimalen Primerdesign. Zusätzlich zu den schon genannten Anforderungen mussten die Primer einige zusätzliche Anforderungen erfüllen. Die Primer sollten ähnliche T_m -Werte aufweisen und durften nicht miteinander hybridisieren. Die generierten Amplifikate sollten unterschiedlich lang sein, damit sie in der Agarose-Gelelektrophorese gut auftrennbar waren.

3.3.4 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, wie zum Beispiel für die Überprüfung der erfolgreichen stabilen Transfektion der Flp-In T-REx HEK293-Zellen verwendet. Zuerst wurde aus den unterschiedlichen Zelllinien RNA isoliert (Kap. 3.7) und diese mit dem *SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit* (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Die eingesetzte cDNA-Konzentration betrug ca. 10 ng/μl. Die folgenden Reagenzien wurden in 96-well Platten pipettiert:

cDNA	5 μl
<i>TaqMan Gene Expression Master Mix</i>	12,5 μl
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i>	1,25 μl
ddH ₂ O	6,25 μl

Danach wurde die 96-well Platte mit Folie verschlossen und zentrifugiert. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Proben wurden dann in einem ABI PRISM 7300 PCR Cycler nach folgendem Zeit- und Temperaturprotokoll inkubiert:

Denaturierung	95°C	10 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 s	
Annealing + Elongation	60°C	1 min	
Kühlung	4°C	∞	

Das Prinzip der Real-Time PCR beruht auf der Messung von Fluoreszenz während des PCR-Zyklus. Regt man die intakte sequenzspezifische Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz an, so wird die Reporterfluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET = *Fluorescence resonance energy transfer*) unterdrückt (Abb. 3.3). Während der Amplifikation wird die gebundene Sonde vom Primer ausgehend durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut. Somit erhöht sich die Entfernung von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher und das Fluoreszenzsignal kann nach Anregung nicht mehr auf den Quencher übertragen werden. Die Fluoreszenz ist proportional zu der Menge der PCR-Produkte. Steigt die Menge an amplifizierter DNA, so steigt auch das Fluoreszenzsignal an.

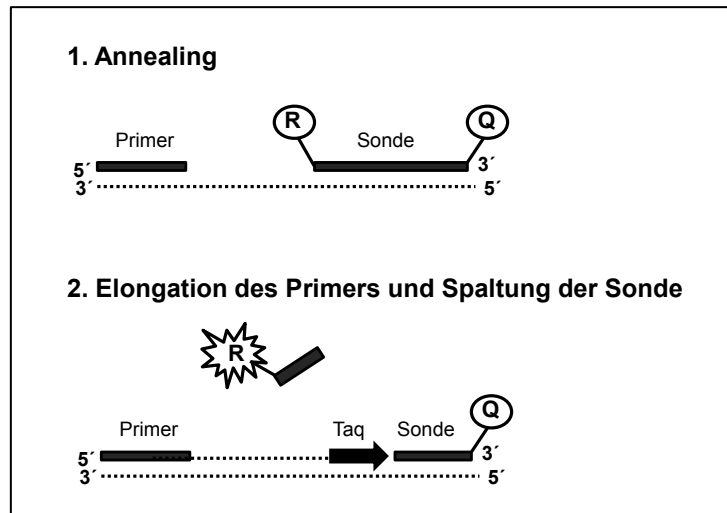


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der quantitativen Real-Time PCR mit dem *TaqMan* System

Im ersten Schritt wurde die sequenzspezifische Anlagerung des Vorwärtsprimers und der fluorogenen Sonde dargestellt. Der fluoreszente Reporterfarbstoff wurde kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Der Quencher-Farbstoff wurde an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Im zweiten Schritt folgte die Verlängerung des Primers und der Abbau der Sonde durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der *AmpliTaQ DNA Polymerase*. Durch die Spaltung der Sonde wurden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs bei Anregung freigesetzt.

Bei fortschreitender Amplifikation wurde die Akkumulation des Fluoreszenzsignals nach jedem Zyklus an den Computer „live“ weitergeleitet und graphisch dargestellt. Der C_T -Wert beschreibt die Zykluszahl bei der sich das Fluoreszenzsignal der Probe deutlich vom Hintergrund abhebt (Applied Biosystems).

Die relative Expression wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode errechnet:

1. ΔC_T -Wert = C_T -Wert des Zielgens - C_T -Wert GAPDH (endogene Kontrolle)
2. $\Delta\Delta C_T$ -Wert = ΔC_T -Wert des Zielgens - ΔC_T -Wert der Kontrollzellen (Flp-In T-REx HEK293) (Kalibrator)

Danach wurden die errechneten Werte in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Dieser Wert gibt die n-fache Expression des transfizierten Transporters im Vergleich zur Kontrollzelllinie an.

3.4 DNA-Klonierung

Bei der DNA-Klonierung wird fremde DNA in einen Klonierungsvektor integriert und dann in bakterielle Wirtszellen eingeschleust. Mit Hilfe einer Antibiotikaresistenz werden die Bakterien selektioniert, welche den Vektor aufgenommen haben. Die rekombinante Plasmid-DNA kann dadurch in der Bakterienkultur in hoher Anzahl vervielfältigt und isoliert werden.

3.4.1 TOPO-Klonierung und Ligation

Für die Klonierung wurden verschiedene Vektoren (pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO, pcDNA5/FRT/TO-TOPO, pcDNA6.2/C-EmGFP/YFP-TOPO) des *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen) verwendet.

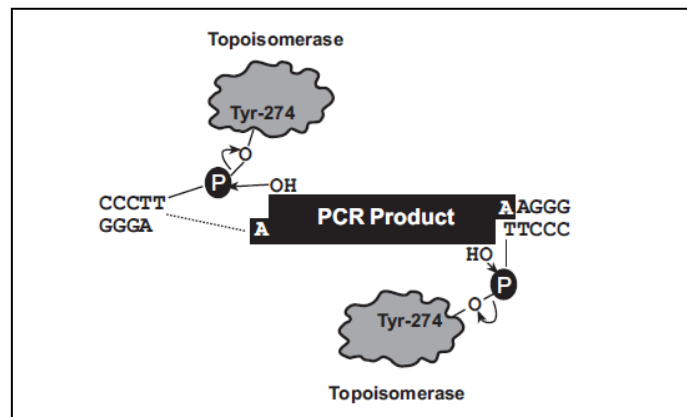


Abb. 3.4: Prinzip der TOPO-Klonierung

Zu Beginn wurde eine PCR mit einer *Taq*-Polymerase durchgeführt, die ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhängen amplifiziert. Der Vektor ist bereits linearisiert und besitzt an seinem 3'-Ende einen T (Thymidin)-Überhang und eine kovalent gebundene Topoisomerase, welche für die Ligation verantwortlich ist. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert.

PCR-Produkt	4 µl
<i>Salt Solution</i>	1 µl
<i>TOPO Vektor</i>	1 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt, bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

3.4.2 Transformation

Für die chemische Transformation wurden 2 µl des Klonierungsansatzes in ein Aliquot der *OneShot TOP10 (Invitrogen)* chemisch kompetenten *E.coli* Bakterienzellen pipettiert, durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Das Einschleusen der DNA in die Bakterien erfolgte durch einen Hitzeschock für genau 30 s in einem Wasserbad bei 42°C. Danach wurde das Aliquot zuerst auf Eis gekühlt und schließlich mit 250 µl des auf 37°C erwärmten *SOC-Mediums* im Warmluftschüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm für eine Stunde geschüttelt. Der Ansatz wurde dann in unterschiedlichen Volumina (50, 100 und 150 µl) auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien, welche das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten, konnten folglich mit Hilfe des Ampicillin-Resistenzgens wachsen.

3.4.3 Subklonierung in den Vektor pcDNA5/FRT/TO-TOPO

Die Konstrukte SLC10A4-EmGFP, CHT-EmGFP, VMAT2-EmGFP, VACHT-EmGFP und DAT-EmGFP wurden in einen pcDNA5/FRT/TO-TOPO Vektor subkloniert. Dafür wurden Primer konstruiert, welche das jeweilige Gen mit dem GFP-Tag umrahmen. Mit diesen wurden die Konstrukte erneut amplifiziert und kloniert. Bei dem pcDNA5/FRT/TO-TOPO unterliegt der CMV-Promotor einer Kontrolle durch das Antibiotikum Tetracyclin. Das bedeutet, dass man die Genexpression durch Zugabe von Tetracyclin initiieren kann.

3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

3.5.1 Mini-Präparation der Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet. Einzelne Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte gepickt und mit dieser Spitze in 4 ml LB-Ampicillin-Flüssigmedium überführt. Die Inkubation der Bakterien erfolgte über Nacht für bis zu 16 h in einem Warmluftschüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm. Glycerol wurde in Portionen von 150 µl abgefüllt, autoklaviert und am folgenden Tag mit 850 µl der LB-Medium-Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und als Ausgangsmaterial für eine erneute Vermehrung anschließend bei -80°C gelagert. Von der Bakteriensuspension wurden 2 ml abgefüllt und bei 16.100 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 250 µl *P1* Puffer vollständig gelöst. Es wurden von 250 µl *P2* Puffer hinzugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals vorsichtig invertiert. Danach wurden 350 µl *N3* Puffer pipettiert

und ebenfalls durch leichtes Schwenken gemischt. Bei der folgenden Zentrifugation für 10 min bei 16.100 *g* bildete sich ein Pellet, von welchem der Überstand in eine *QIAprep* Säule überführt und für 60 s zentrifugiert wurde. Die an die Silikagelmembran gebundene DNA wurde durch Zugabe von 500 μ l *PB* Puffer und 750 μ l *PE* Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation für 60 s und ein Verwerfen des Durchflusses. Die *QIAprep* Säule wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und die gebundene DNA in 50 μ l Elutionspuffer durch Zentrifugation gelöst. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.5.2 Midi-Präparation der Plasmid-DNA

Für die Midi-Präparation von Plasmid-DNA wurde das *NucleoBond Xtra Midi-Kit* (Macherey Nagel) verwendet. Aus einer Glycerinkultur (siehe 3.5.1) wurden 50-100 ml LB-Ampicillin-Medium im Verhältnis 1:1000 angeimpft und über Nacht bei 225 *rpm* und 37°C im Warmluftschüttelinkubator inkubiert. Zuerst erfolgte die Pelletierung der Bakterien in einem 50 ml Reaktionsgefäß durch Zentrifugation bei 4.300 *g*. Das Pellet wurde in 10 ml *RES* Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml *LYS* Puffer und Inkubation bei RT für 5 min lysiert. Gleichzeitig wurden die *NucleoBond Xtra* Säulen, mit integriertem *NucleoBond Xtra* Filter, mit 12 ml *EQU* Puffer equilibriert. Das Lysat wurde durch die Zugabe von 10 ml *NEU* Puffer und mehrmaliges vorsichtiges Schwenken neutralisiert und auf die angefeuchteten Filter gegeben. Filter und Säule wurden einmal mit 5 ml *EQU* Puffer gewaschen und dann verworfen. Nach zwei Waschschriften mit jeweils 8 ml Waschpuffer konnte die an die Säule gebundene DNA in 5 ml *ELU* Puffer eluiert werden. Anschließend wurde eine Isopropanol-Präzipitation durchgeführt, um die DNA-Konzentration zu erhöhen und Salze zu entfernen. Hierfür wurde die Plasmid-DNA mit 3,5 ml Isopropanol gemischt und 60 min bei 4.300 *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene DNA-Pellet mit 2 ml 70% Ethanol (RT) gewaschen und für 30 min bei 4.300 *g* und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, das Pellet getrocknet, in 200 μ l ddH₂O gelöst und die Konzentration gemessen (siehe 3.1.6).

3.6 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma *GATC Biotech* (Konstanz) durchgeführt. Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 30-100 ng/ μ l in 20 μ l Volumen gefordert, und für selbstdesignte Primer wurde eine Konzentration von 10 pmol/ μ l in 20 μ l ddH₂O verlangt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden per E-mail im FASTA-Format und als Chromatogramm gesendet und konnten mit den Programmen *DNASTar* und *FinchTV* ausgewertet werden.

3.7 Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA

3.7.1 Total-RNA Isolierung aus Zellen und Gewebe

Die Isolierung von RNA wurde mit der Substanz *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich) durchgeführt. *TRI Reagent* ist eine Mischung aus Phenol und Guanidinthiocyanat, einem starken Denaturierungsmittel, welches zelluläre RNasen inaktiviert. In dieser Arbeit erfolgte die RNA-Isolierung aus stabil transfizierten Zellen und aus Gewebe der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus. Für die Gewinnung von RNA aus Zellen wurden diese durch 1 ml Trypsin-EDTA aus der Zellschale abgelöst und ca. 5×10^6 Zellen der jeweiligen Zelllinie ausgezählt. Die Zellen wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und herunter zentrifugiert (1.000 g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml *TRI Reagent* durch mehrmaliges Aufziehen in eine Pipette lysiert. Dieses Lysat wurde für 5 min bei RT inkubiert. Für die RNA-Extraktion aus dem Gehirn der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} und dem korrespondierenden Wildtyp wurden diese per zervikaler Dislokation getötet. Die Organe wurden steril entnommen, in kleine Stücke mit einer Größe von ca. 0,5 cm x 0,5 cm zerteilt und ausgewogen. Die Proben wurden in *RNAlater* (Ambion), einem RNA-Stabilisierungsreagenz, für eine Nacht im Kühlschrank gelagert und danach bis zur weiteren Verwendung bei -20°C konserviert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebeproben mit einer sterilen Pinzette entnommen und mit 2 ml *TRI Reagent* pro 100 mg Organgewicht versetzt. Die Homogenisierung wurde mit einem Ultra-Turrax für 3 x 20 s durchgeführt. Danach wurde das Homogenat zentrifugiert (12.000 g, 4°C, 10 min), um unlösliches Material zu beseitigen. Der Überstand wurde in ein RNase-freies 2 ml Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit konnten sowohl Gewebe- als auch Zellproben nach einem einheitlichen Protokoll weiterbehandelt werden. Es wurde 0,2 ml Chloroform pro ml verwendetes *TRI Reagent* zu dem Probenansatz hinzugegeben. Die Proben wurden 15 s lang stark geschüttelt und erneut für 10 min bei RT inkubiert. Durch die Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 15 min) wurde die Mischung in drei unterschiedliche Phasen separiert. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, die intermediäre Phase die DNA und die untere, rote organische Phase enthielt die Proteine. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Es wurden 0,5 ml Isopropanol pro ml verwendetes *TRI Reagent* hinzugegeben und erneut 10 min bei RT inkubiert. Während der Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 10 min) wurde die RNA gefällt und es bildete sich ein RNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 75% Ethanol pro verwendetem *TRI Reagent* gewaschen, gut durchmischt und nochmals zentrifugiert (7.500 g, 4°C, 5 min). Das Pellet wurde dann ca. 15 min bei RT getrocknet bis das gesamte Ethanol verdunstet war und in 20-40 µl molekularbiologischem

DEPC-Wasser je nach Pelletgröße gelöst. Zuletzt wurde die Konzentration gemessen (Kap. 3.1.6) und die RNA bei -80°C aufbewahrt.

3.7.2 cDNA-Synthese aus Total-RNA

Bei der cDNA-Synthese wird die RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT), in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Um eventuell noch vorhandene DNA-Reste in der RNA zu beseitigen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurden 4 µl (0,25 µg/µl) RNA, 1 µl 10 x Puffer, 4 µl ddH₂O, 0,25 µl *RNaseOUT* und 1 µl *DNase* (Fermentas) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und inkubiert (37°C, 30 min). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 µl 25 mM EDTA zugegeben und erneut inkubiert (65°C, 10 min).

Die Synthese von cDNA aus Total-RNA erfolgte mit dem *SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). 8 µl RNA (0,125 µg/µl) wurden mit 1 µl *Random Hexamer* Primern und 1 µl dNTPs gemischt, für 5 min bei 65°C inkubiert und sofort im Anschluß für 1 min auf Eis gekühlt. Es wurden pro Ansatz 10 µl *cDNA Synthesis Mix* hinzu pipettiert. Die Zusammensetzung war wie folgt:

10 x <i>RT buffer</i>	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
<i>RNaseOUT</i>	1 µl
<i>SuperScriptIII RT</i>	1 µl

Nach einer Wartezeit (10 min, RT) wurde der Ansatz im Wasserbad inkubiert (50°C, 50 min). Die *SuperScriptIII Reverse Transcriptase* ist eine Version der *M-MuLV (Moloney murine leukemia virus)* Reversen Transkriptase, deren Arbeitsoptimum bei einer Temperatur von 42-55°C liegt. Durch anschließendes Erhitzen der Proben auf 85°C für 5 min wurde die Synthese gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde mit 60 µl DEPC-ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 80 µl aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.8 Zellkultur

In einem Zellkulturlabor sollten einige grundsätzliche Maßnahmen zum sterilen Arbeiten beachtet werden. Oberste Priorität hat der Schutz der Zellkulturen vor Kontaminationen jeglicher Art. Deshalb wurde der Laborkittel in der Schleuse gewechselt, die Hände vor dem Arbeiten mit 70 % Alkohol desinfiziert und Einmal-Handschuhe getragen. Die verwendeten Materialien wurden autoklaviert, sterilisiert oder desinfiziert. Die Einarbeitung in die Zellkultur und Hilfe bei den folgenden zellbiologischen Methoden wurde von Herrn Klaus Schuh durchgeführt.

3.8.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden in Brutschränken unter 95 % Wasserdampfsättigung, 5 % CO₂ und 37°C in ihrem entsprechenden Medium kultiviert. Die Flp-In T-REx HEK293-Zelllinie wurde in regelmäßigen Abständen mit Zeocin und Blasticidin selektioniert, die daraus resultierenden stabilen Zelllinien mit Hygromycin B und Blasticidin und die GripTite 293 MSR-Zellen mit Geneticin.

3.8.2 Passagieren und Aussäen der Zellen

Die Zellen wurden als Monolayerkulturen in 75 cm² Kulturflaschen im Brutschrank gezüchtet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Laminarflow-Sicherheitswerkbank durchgeführt. Wachstum und Substratverbrauch der Zellen waren bestimmend für den Zeitpunkt eines Mediumwechsels bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80-90 %. Dann wurden die Zellen gesplittet, d.h. sie wurden von dem Boden der Kulturflasche abgelöst und in einer verminderten Zellanzahl weiterkultiviert oder für die Experimente ausgesät. Um die Zellen abzulösen, wurde zuerst das Medium abgezogen, zweimal mit PBS gewaschen, 1 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen wurden die Zellen von dem Untergrund der Zellkulturflasche gelöst und die Reaktion letztlich durch Zugabe von 2 ml Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden in 1:2 bis 1:10 Verdünnungen auf neue Kulturflaschen verteilt und weiterkultiviert oder in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in 24-well Schalen für die Experimente ausgesät. Für immunzytologische Versuche wurden die Zellen auf Deckgläschen in 24-well Schalen kultiviert. Für Zellen mit einer geringen Adhärenzfähigkeit (Flp-In T-REx HEK293-Zellen) wurden die 24-well Schalen über einen Zeitraum von 30 min mit Polylysine beschichtet. Die Beschichtung verbesserte die Haftung und verhinderte ein vorzeitiges Ablösen der Zellen bei vermehrten Waschschritten.

3.8.3 Kryokonservierung der Zellen

Das Einfrieren und Lagern der Zelllinien wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden 900 µl der Zellsuspension mit 100 µl DMSO gemischt und in Kryovials gegeben. Die Zellen wurden dann in einer vorgekühlten Styroporkiste über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in den Flüssigstickstoffbehälter für die Langzeitlagerung überführt.

3.8.4 Rekultivierung eingefrorener Zellen

Für eine Rekultivierung der eingefrorenen Zellen wurden die Kryovials in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt und die Zellsuspension für 5 min bei 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Schutzsubstanz DMSO und wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellmedium resuspendiert, in eine 25 cm² Kulturflasche überführt und mit 5 ml Zellmedium versehen.

3.9 Transfektion eukaryotischer Zellen

Als Transfektion bezeichnet man den Vorgang der Einschleusung von Fremd-DNA oder RNA in den Zellkern eukaryotischer Zellen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Plasmid-DNA chemisch transfiziert, um die Funktion der in den Zellen exprimierten Proteine zu analysieren. Man unterscheidet zwischen einer transienten (vorübergehenden) Transfektion und einer stabilen Transfektion, bei welcher die DNA stabil in das Genom der Zellen integriert wird.

3.9.1 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion wird die DNA nur in die Zellen aufgenommen, die zum Zeitpunkt der Transfektion vorhanden sind. Die DNA wird nicht in das Genom der Zelle integriert und deshalb auch nicht bei der Zellteilung in die nächste Generation weitergegeben. Die genetische Veränderung ist nicht permanent und die Proteinexpression ist auf einen gewissen Zeitraum (24-96 h) limitiert. Als Transfektionsreagenz wurde *Lipofectamin 2000* (Invitrogen) verwendet und als Transfektionsmedium *Opti-MEM Serum Reduced Medium*. Hierbei bilden positiv geladene Chemikalienkomplexe mit negativ geladenen Nukleinsäuren. Das genetische Material wird dann über Liposomen-Komplexe in die Zellen transferiert. Ziel war eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zelltoxizität. Dafür wurden GripTite 293 MSR-Zellen in 24-well Platten ausgesät und bis zu einer

Konfluenz von 90-95 % in Zellmedium ohne Antibiotika kultiviert. Der weitere Ablauf ist in folgendem Schema skizziert.

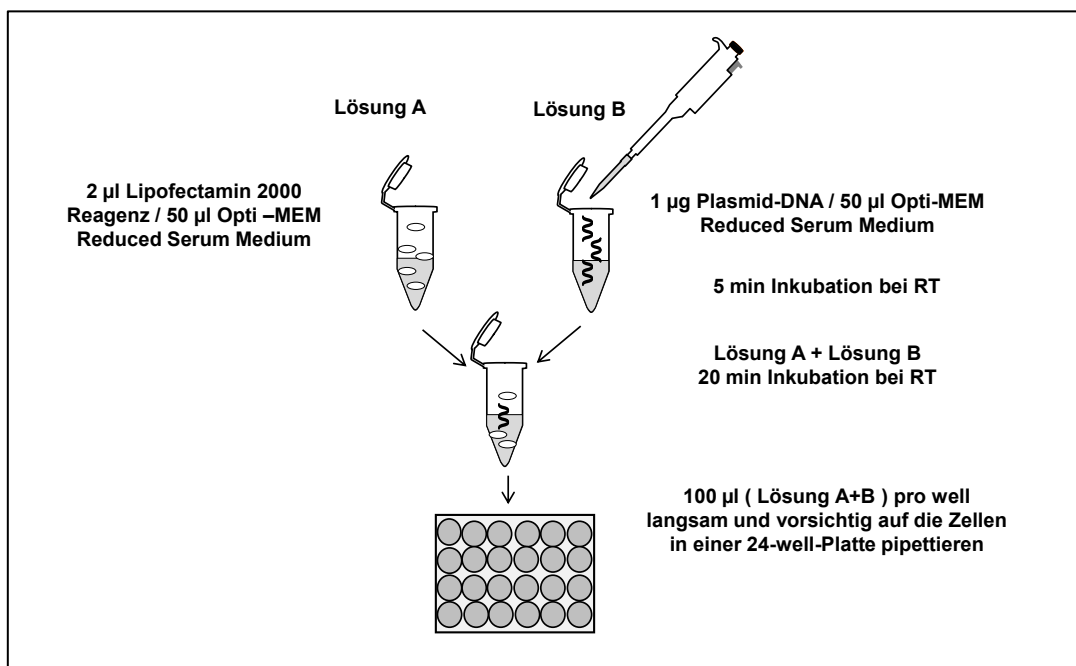


Abb. 3.5: Schema einer transienten Transfektion

Die Zellen wurden nach der Transfektion für ca. 16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann einmal mit PBS gewaschen und in dem jeweiligen Zellmedium weiter kultiviert. 48 h nach der Transfektion wurden die Experimente (Aufnahmemessungen, Immunfluoreszenz) mit den transfizierten Zellen durchgeführt.

3.9.2 Stabile Transfektion

Für diese Methode wurde das *Flp-In System* (Invitrogen) verwendet. Es besteht aus einer Flp-In T-REx HEK293-Zelllinie und einem systemkompatiblen Vektor, welche beide eine *FRT site* (*Flp* Rekombinase-Erkennungssequenz) enthalten sowie dem pOG44-Vektor, welcher für die *Flp* Rekombinase kodiert. Werden pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO oder pcDNA5/FRT/TO-TOPO Vektoren mit dem pOG44 Plasmid in die Flp-In T-REx HEK293-Zelllinie kotransfiziert, wird das Enzym *Flp* Rekombinase gebildet. Diese erkennt und schneidet an der Erkennungssequenz, der *FRT site* in dem Genom der Zellen und im Expressionsplasmid und führt zu einer zielgerichteten Integration des Konstrukts an der *FRT site* in das Genom der Zellen. Erfolgreich transfizierte Zellen können durch die Zugabe von Hygromycin selektioniert werden. Stabil transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zelllinien wurden für SLC10A4, DAT, VMAT2 und VACHT jeweils mit einem V5-His-Tag und mit einem GFP-Tag generiert. Für die stabile Transfektionen der Transporter mit einem GFP-Tag wurden diese zunächst in den pcDNA5/FRT/TO-TOPO Expressionsvektor subkloniert. Anschließend wurden ca. $1,6 \times 10^6$ Flp-In T-REx HEK293-Zellen in die Vertiefung einer 6-Well-Schale mit 4 ml Zellmedium ohne Antibiotika ausgesät. Bei einer erreichten Konfluenz der Zellen von ca. 80-90 % wurde für jedes Well der folgende Ansatz pipettiert.

Expressionsplasmid	1 µg
pOG44	7 µg
Medium (ohne FKS, ohne Antibiotika)	x µl
	<hr/> 50 µl

Parallel dazu wurde ein zweiter Ansatz pipettiert mit 24 µl *Lipofectamin 2000* (Invitrogen), d.h. 3 µl Lipofectamin pro µg Plasmid-DNA (Expressionsplasmid und *pOG44*) und 26 µl Medium (ohne FKS, ohne Antibiotika). Beide Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert, zusammengeführt und nach einer weiteren Inkubation für 30 min tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken der Platte verteilt. Das Medium wurde nach 24 h gewechselt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellschale gelöst. Durch die Zugabe von 1,5 ml Zellmedium wurde die Reaktion gestoppt und jeweils 1 ml der Zellsuspension mit 9 ml Zellmedium in eine Polylysin-beschichtete Petrischale gegeben. Sobald sich die Zellen am Boden abgesetzt hatten, wurde dem Zellmedium das Selektionsantibiotikum Hygromycin (150 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Dadurch konnten die Zellen weiter wachsen, welche das Hygromycinresistenzgen mit der erfolgreichen Integration des Expressionsvektors erworben hatten. Nach zwei bis drei Wochen konnten einzelne Klone mit Hilfe von Klonierungsringen gepickt und in 24-well Schalen überführt werden. Die Klone wurden kultiviert und ihre funktionelle Expression mittels qPCR, Immunfluoreszenz und Transportstudien untersucht.

3.9.3 Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression

Die Subklonierung der Konstrukte mit einem GFP-Tag in den pcDNA5/FRT/TO-TOPO Expressionsvektor und ihre stabile Transfektion in das Genom der Flp-In T-REx HEK293-Zellen führte zu einer regulierbaren Proteinexpression über die Zugabe von Tetracyclin. Das bedeutet, dass die Proteinexpression des *gene of interest* in der Abwesenheit von Tetracyclin unterdrückt und die Transkription durch Zugabe von Tetracyclin induziert wird. Dafür sind zwei Komponenten verantwortlich. Zum einen der verwendete Expressionsvektor, bei welchem die Expression des *gene of interest* durch einen CMV-Promotor kontrolliert wird, in den zwei *Tet-Operator* inseriert wurden, welche die Bindungsstellen für den Tet-Repressor darstellen. Zum anderen die Flp-In T-REx HEK293-Zelllinie, welche durch die zusätzliche stabile Integration des pcDNA6/TR Vektors für die Bildung des Tet-Repressors verantwortlich ist. Dieser Tet-Repressor bildet in der Abwesenheit von Tetracyclin ein Homodimer, welches mit einer extrem hohen Affinität an den Tet-Operator bindet und somit

die Transkription des *gene of interest* unterdrückt. Nach der Zugabe von Tetracyclin, bindet dieses an den Tet-Repressor und führt zu einer Konformationsänderung, welche eine Bindung an den Tet-Operator unmöglich macht. Dadurch kann das *gene of interest* erfolgreich transkribiert werden. Die Tetracyclin-Induktion erfolgte mindestens 24 h vor den durchzuführenden funktionellen Experimenten mit einer Konzentration von 1 µg/ml.

3.10 Transportmessung an eukaryotischen Zellen

3.10.1 Vorbereitung der Transportmessung

Die Messlösung bestand zu einem gewissen Anteil aus radioaktiv-markierter Substanz, wobei die erwünschte Konzentration durch Zugabe von unmarkierter Substanz eingestellt wurde. Das errechnete Volumen an radioaktiv-markierter, in Ethanol gelöster Substanz wurde pipettiert und unter N₂-Begasung abgedampft. Danach wurden Transportpuffer und unmarkierte Substanz hinzugegeben und die Mischung im Wasserbad bei 37°C für mindestens 30 min inkubiert. Nach mehrmaligem Vortexen konnte die Messlösung verwendet werden. Für ein besseres Handling der 24-well Schalen wurden diese mit einem heißen Draht in Reihen von jeweils drei oder vier wells geschnitten.

3.10.2 Aufnahmemessung an Zellen mit intakter Plasmamembran

Die Einarbeitung in diese Methode erfolgte durch Frau Anita Neubauer, alle Versuche wurden daraufhin selbstständig durchgeführt. Diese Art der Aufnahmemessung wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet, um Transportproteine zu charakterisieren, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind. Die V5-His-Transporter-Konstrukte wurden stabil in Flp-In T-REx HEK293-Zellen aber auch transient in GripTite 293 MSR-Zellen transfiziert. Als Positivkontrollen dienten die bereits charakterisierten Neurotransmittertransporter SERT, DAT und CHT1. Nicht transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen oder auch mit einem Leervektor transient transfizierte GripTite 293 MSR-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die gewünschten Zellen wurden in Polylysin-beschichteten 24-well Schalen ausgesät (GripTite 293 MSR-Zellen ohne Polylysin) und bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % in dem entsprechenden Medium kultiviert. Das Zellmedium wurde abgezogen und die Zellen 3 x mit PBS (37°C) gewaschen und dann in dem jeweiligen Transportpuffer bei 37°C auf einer Wärmeplatte für 15 min equilibriert. Danach erfolgte, falls erforderlich, die Präinkubation mit einem spezifischen Inhibitor bei 37°C. Der Transportpuffer wurde mit einer Glaspipette und einer Vakuumpumpe abgezogen und die Aufnahme durch die Zugabe der Messlösung (300 µl/well) gestartet. Nach einer Inkubation über die erwünschte Zeit wurde

die Messlösung auf eine saugfähige Unterlage entleert und die Aufnahme durch fünfmaliges Waschen der Zellen in PBS (4°C) gestoppt.

3.10.3 Aufnahmemessungen an enzymatisch vorbehandelten Zellen

Die Transportmessungen wurden an stabil transfizierten Flp-In T-REx HEK293-Zellen durchgeführt. Nicht transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Vorbereitung erfolgte wie unter 3.10.1 beschrieben. Anstatt einer Präinkubation mit einem Inhibitor inkubierte man die Zellen mit 1 U des Enzyms Thrombin gelöst in 200 µl Transportpuffer pro well für 3 h bei 37°C. Im Anschluss folgte die Aufnahmemessung wie unter 3.10.3 beschrieben.

3.10.4 Aufnahmemessung an Zellen mit permeabilisierter Plasmamembran

Die Transportmessung an Zellen mit permeabilisierter Plasmamembran wurde in der Literatur bereits beschrieben (Erickson et al., 1992). Sie wurde dazu verwendet, um Transportproteine zu charakterisieren, welche in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind. Die Inkubation der Zellen mit Digitonin, einem Steroid-Glykosid aus *Digitalis purpurea*, führte zu einer selektiven Permeabilität der Plasmamembran durch eine Komplexbildung mit Cholesterol. Die Barrierefunktion der Plasmamembran für niedermolekulare Substrate wurde aufgehoben, wohingegen die Architektur der Zellwand und die Membranen der intrazellulären Kompartimente erhalten blieben. Das gewünschte Substrat konnte auf diese Weise in die Zellen diffundieren und über den jeweiligen vesikulären Transporter in die intrazellulären Kompartimente akkumulieren. Die Etablierung dieser Methode und die darauf folgenden Messungen wurden selbstständig durchgeführt. Es wurde mit Flp-In T-REx HEK293-Zellen gemessen, welche stabil transfiziert waren mit V5-His-Transporter-Konstrukten. Als Postitivkontrollen dienten die bereits charakterisierten vesikulären Transporter VACHT und VMAT2. Nicht transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die gewünschten Zellen wurden in Polylysin-beschichteten 24-well Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % in dem entsprechenden Medium kultiviert. Das Zellmedium wurde abgezogen und die Zellen dreimal mit Kalium-Puffer (37°C) gewaschen und dann in Permeabilisierungspuffer (15 µM Digitonin in Kalium-Puffer, 0,5 ml/well) für 15 min auf einer Wärmeplatte bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte, falls erforderlich, die Präinkubation mit einem spezifischen Inhibitor gelöst in Kalium-Puffer für 10 min bei 37°C. Die Aufnahme wurde durch die Zugabe der Messlösung (300 µl/well) gestartet. Nach einer Inkubation über die erwünschte Zeit wurde die Messlösung auf eine

saugfähige Unterlage entleert und die Aufnahme durch fünfmaliges Waschen der Zellen in PBS (4°C) gestoppt.

3.10.5 *cis*-Hemmung der Neurotransmittertransporter

Für eine vollständige Charakterisierung der Positivkontrollen gehörte, zusätzlich zu einer Aufnahme des Substrates, auch die Hemmung der Aufnahme mit einem zugehörigen Hemmstoff. Der Inhibitor kann ebenfalls an der Substratbindungsstelle des Transporters interagieren und hemmt dadurch die Aufnahme des Substrates. Wenn Substrat und Inhibitor auf der gleichen Seite der Zellmembran (extrazellulär) zugegeben werden, bezeichnet man dies als *cis*-Hemmung. Der im jeweiligen Transportpuffer gelöste Hemmstoff wurde mit den Zellen präinkubiert (10 min) und befand sich auch für die anschließende Aufnahmemessung in der verwendeten Messlösung. Der Ablauf der Aufnahmemessung wurde wie unter 3.10.2 und 3.10.4 beschrieben durchgeführt.

3.10.6 Flüssigszintillationsmessung

Nach der Aufnahmemessung wurden die Zellen bei RT getrocknet und in jedes well 400 µl Lysepuffer pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Wärmeschrank. Am folgenden Tag wurden 250 µl des Zelllysats in ein Minivial pipettiert und mit 3 ml Szintillatoröl gevortext. Die aufgenommene Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler detektiert und die Werte dazu verwendet, den Substanztransport pro mg Gesamtprotein und Zeiteinheit (pmol/mgProtein/min) zu errechnen.

3.10.7 Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Proteine wurde mit der bereits an unserem Institut etablierten, modifizierten Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951) durchgeführt. Für jedes Experiment wurde eine Standardreihe (0, 10, 20, 40, 80, 200, 400, 600, 800 µg BSA/ml) pipettiert. Es wurden jeweils 3 x 20 µl des Standards oder des Zelllysats in eine 96-well Schale pipettiert. Nach der Zugabe von 200 µl Lösung C pro well und einer Inkubation von 15 min wurden 40 µl Folinreagenz zu jeder Probe pipettiert. Die Extinktion der resultierenden blauen Färbung wurde mit einem ELISA-Reader bei 655 nm nach einer Inkubation von 2 h analysiert. Aus den gemessenen Extinktionen der bekannten Konzentrationen der Standardreihe wurde eine Eichgerade bestimmt, aus welcher man die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe errechnen konnte.

3.10.8 Auswertung der Experimente

In einer Excel-Tabelle wurden die Ergebnisse aus der Flüssigszintillation und der Proteinbestimmung zusammengefasst und die Substrataufnahme in die Zellen in pmol Substrat/mg Protein errechnet. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Programm *GraphPad Prism 4* durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.D. dargestellt. Bei unabhängigen Stichproben wurde ein ungepaarter *t-Test* verwendet, bei Mehrfachvergleichen eine *One-way ANOVA* mit einem *Bonferroni's Multiple Comparison Test* oder eine *Two-way ANOVA* mit einem *Sidak's* oder *Tukey's Multiple Comparison Test*.

3.11 Immunfluoreszenz

3.11.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit dem Anti-V5-His Antikörper an transfizierten Zellen

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde an transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen (3.9.1) und an stabil transfizierten Flp-In T-REx HEK293-Zellen zum Nachweis der V5-His-markierten Proteine durchgeführt. Die gewünschten Zellen wurden in 24-well Schalen auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen (GripTite 293 MSR-Zellen ohne Polylysin) in einer Größenordnung von ca. 180.000 Zellen/well ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % in dem entsprechenden Medium kultiviert oder, wie bereits beschrieben, transient transfiziert. Das Zellmedium wurde abgezogen und die Zellen mit PBS bei RT für 5 min gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 2 % PFA für 15 min auf Eis. Nach 2 weiteren Waschschritten mit PBS bei RT wurde mit einem Glycinpuffer (Puffer A) für 5 min inkubiert. Mit einer weiteren 5-minütigen Inkubation in einem Glycinpuffer, der zusätzlich 0,2 % Triton X-100 enthielt, wurden die Zellen permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von Blockierlösung für 30 min bei RT abgesättigt. Für den Nachweis des V5-His-Tags wurde der monoklonale Maus anti-V5-His Antikörper (Invitrogen) verwendet. Der primäre Antikörper wurde in der Blockierlösung in einer Verdünnung von 1:5.000 gelöst und auf die Zellen verteilt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgezogen und es wurde 3 x 5 min mit PBS auf dem Schüttler gewaschen. Der fluoreszierende Sekundärantikörper Alexa Fluor 488-gekoppelte Ziege anti-Maus (Invitrogen) wurde 1:800 mit der Blockierlösung verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde nochmals 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellkernfärbung erfolgte durch eine Inkubation für 5 min bei RT mit einer DAPI/Methanol Lösung in einer Verdünnung von 1:5.000. Die Zellen wurden anschließend

mit Methanol für 5 min gewaschen, an der Luft getrocknet und mit ca. 5-10 µl *ProLong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen) auf einem Objektträger eingedeckelt.

3.11.2 Direkte Fluoreszenz EmGFP-markierter Proteine an transfizierten Zellen

Aufgrund der Eigenfluoreszenz des GFP-Tags konnten die EmGFP-markierten Proteine mittels direkter Fluoreszenz untersucht werden. Dafür wurden transient transfizierte GripTite 293 MSR-Zellen (3.9.1) und stabil transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen verwendet. Die gewünschten Zellen wurden in 24-well Schalen auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen in einer Größenordnung von ca. 180.000 Zellen/well ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90 % in dem entsprechenden Medium kultiviert, oder wie bereits beschrieben, transient transfiziert. Das Zellmedium wurde abgezogen und die Zellen mit PBS bei RT für 5 min gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 2 % PFA für 15 min auf Eis. Die Zellen wurden dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und die Zellkerne anschließend mit DAPI/PBS (1:5.000) bei RT angefärbt. Nach einem erneuten Waschen mit PBS für 5 min, konnten die Zellen an der Luft trocknen und auf Objektträgern in ca. 5-10 µl *ProLong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen) eingedeckelt werden.

3.11.3 Immunfluoreszenz an histologischen Organpräparaten

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen an histologischen Organpräparaten wurden B6.129S5-*Slc10a4^{tm1Lex}* Knockout-Mäuse und C57BL/6 Mäuse, welche den korrespondierenden Wildtyp darstellen, durch zervikale Dislokation getötet. Die Harnblasen wurden sofort vorsichtig freipräpariert und für 2 h bei 4°C in 4 % PFA fixiert. Um eine Kryoprotektion zu erhalten, wurden die Organe über Nacht in einer 20 %-igen Sucroslösung inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Organe mit *Tissue-Tek O.C.T Compound Einbettmedium* (Sakura Finetek Europe B.V.) umgeben, in vorgekühltes Isopropanol getaucht und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte, wenn nötig, bei -80°C. Die Gewebestücke wurden in *Tissue-Tek O.C.T* aufgeblickt und an einem Kryostat bei einer Kammertemperatur von -24°C geschnitten. Es wurden Schnitte mit 16 µm und 25 µm Dicke angefertigt und auf *SuperFrost Plus Objektträger* (Menzel-Gläser) aufgefroren, welche sich durch eine besonders gute Adhäsion auszeichnen. Die Gewebeschnitte wurden dann dreimal für jeweils 5 min mit ungefähr 150 ml 0,1 M Phosphatpuffer (PB) auf einem Schüttler rehydriert. Für den nachfolgenden Schritt mussten die Gewebestücke auf den Objektträgern mit einem *DAKO Pen* Stift umrundet werden. Dies sollte das Auslaufen der Flüssigkeit und somit das Austrocknen der Präparate verhindern. Nun folgte die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Zugabe von jeweils 200 µl Blockierlösung auf die einzelnen Objektträger und deren

Inkubation bei RT für 1 h. Für den Nachweis des Slc10a4-Proteins wurde der Anti-Slc10a4 Antikörper (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Der primäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 gelöst und auf die Objektträger pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 4°C in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Box, um die Verdunstungsgefahr zu verringern. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgezogen und die Schnitte 4 x 5 min in PB auf dem Schüttler gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Alexa Fluor 488-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen (Invitrogen) Sekundärantikörper. Er wurde 1:800 mit der Antikörperlösung verdünnt, auf die Schnitte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Parallel dazu wurden auch Experimente mit dem Cy3-gekoppelten Esel anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Dianova) (1:800) durchgeführt. Danach wurde nochmals 4 x 5 min mit PB gewaschen. Die Zellkerne wurden mit DAPI/PBS in einer Verdünnung von 1:5.000 für 10 min bei RT angefärbt. Nach wiederholtem Waschen (3 x 5 min) in PB wurden jeweils ca. 10 µl *ProLong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen) auf die Präparate pipettiert und diese mit Deckgläschen eingedeckelt.

3.12 Mikroskopie

Die Dokumentation der Immunfluoreszenzbilder erfolgte an den Fluoreszenzmikroskopen *LeicaDM5500B* mit einer S/W Kamera *DFC340 FX* und *LeicaDM6000B*. Die Auswertung und Bildbearbeitung wurde mit den Programmen *LAS AF6000* Software mit *3D Deconvolution*, *FW 4000 V1.2 Fluorescence Workstation*, *Deblur V2.3.2 Deconvolution* und *3D-Reconstruction (DM6000B)* von *Leica Microsystems* durchgeführt.

3.13 Heterologe Expression in *X. laevis* Oozyten

3.13.1 Tierhaltung

Die Haltung der Frösche erfolgt unter Standardbedingungen in 250 l fassenden Kunststoffbecken bei einer Raumtemperatur von 18-20°C, wobei die maximale Anzahl an Tieren pro Becken nicht über zehn liegen sollte. Die Becken verfügen über einen kontinuierlichen Wasserdurchfluss und werden über Druckluft mit Sauerstoff angereichert. Die Fütterung erfolgt einmal in der Woche mit Pellets, die vor der Fütterung für 30 min in Wasser eingeweicht werden. Am folgenden Tag wird das Wasser der Becken komplett gewechselt.

3.13.2 *X. laevis* Oozyten

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *X. laevis* wurden dazu verwendet, heterologe Proteine zu exprimieren und funktionell zu charakterisieren. Dafür wurde *in vitro* eine proteinkodierende cRNA synthetisiert. Nach der Mikroinjektion der cRNA in die Oozyten erfolgte die Translation der Proteine. Die Transportproteine konnten dann in die Plasmamembran der Oozyten eingebaut und ihre Transporteigenschaften untersucht werden. Diese Methode wurde vor einigen Jahren bereits an unserem Institut durchgeführt und von mir im Rahmen dieser Doktorarbeit mit Hilfe von Anita Neubauer, Regina Leidolf und Dr. Barbara Döring erneut etabliert, und in Anlehnung an die am Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführten Methode, verfeinert.

3.13.3 Linearisierung der Plasmid-DNA

Als erster Schritt bei der cRNA-Synthese wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe eines Restriktionsverdaus linearisiert. Dafür wurde ein Restriktionsenzym verwendet, welches nur einmal im Plasmid schneidet.

Plasmid-DNA	5 µg
Fermentas FastDigest 10 x Puffer	5 µl
Restriktionsenzym <i>KpnI</i>	5 µl
ddH ₂ O add	50 µl

Der Ansatz wurde gut gemischt, kurz abzentrifugiert und in einem Wasserbad für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Bei der cRNA-Synthese können 3'-Basenüberhänge am Ende der DNA problematisch sein. Um ein sogenanntes *blunt end* herzustellen, wurde durch eine *Klenow-Reaktion* der durch *Kpn1*-Verdau entstandene 3'-Überhang durch die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität abgebaut. Hierfür wurden 3,6 µl dNTP-Mix und 1 µl *Klenow-Fragment* (MBI Fermentas) zu dem gesamten Restriktionsansatz hinzugegeben und für 15 min bei 25°C inkubiert. Diese Reaktion wird abgestoppt durch die Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA und eine Inkubation bei 75°C für 20 min. Schließlich wurde die verdaute DNA durch zweimalige Phenol/Chloroform Extraktion (3.1.1) aufgereinigt und mit Ethanol präzipitiert (3.1.2). Die getrockneten DNA-Pellets wurden für 30 min bei RT in 5,5 µl *TE*-Puffer resuspendiert. Von diesem Volumen wurden 0,5 µl für eine Analyse per Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.4) verwendet.

3.13.4 cRNA-Synthese

Für die cRNA-Synthese wurde das *mMessage mMachine Kit* (Ambion) verwendet. Es ermöglicht die *in vitro* Synthese großer Mengen an RNA, die an ihrem 5'Ende ein Cap-Analog (7-methyl guanosin cap) trägt. Die T7-RNA-Polymerase bindet an den T7-Promotor der linearisierten Plasmid-DNA und schreibt diese um in eine komplementäre RNA (cRNA). Dafür wurden die folgenden Reagenzien für einen 20 µl Ansatz zusammenpipettiert, gemischt, herunterzentrifugiert und bei 37°C für 90 min inkubiert.

2 x NTP/CAP	10 µl
10 x Reaktionspuffer	2 µl
linearisierte Plasmid-DNA	1 µg
Enzymmix	2 µl
Nuklease-freies Wasser	add 20 µl

Um die Template DNA zu entfernen, wurde 1 µl TURBO DNase zugegeben und erneut bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde mit dem *Poly (A) Tailing Kit* (Ambion) ein ca. 150 bp langes PolyA-Signal an das RNA-Transkript angehängt. In diesem Kit wurde dafür eine *E.coli* Poly(A)-Polymerase (*E*-PAP) und ATP verwendet. Die folgenden Komponenten wurden bei RT pipettiert.

<i>mMessage mMachine</i> Reaktion	20 µl
Nuklease-freies Wasser	36 µl
5 x <i>E</i> -PAP Puffer	20 µl
25 mM MnCl ₂	10 µl
10 mM ATP	10 µl

Aus diesem Reaktionsansatz wurden 0,5 µl entnommen, um die Größe der cRNA ohne PolyA-Signal mittels Agarose-Gelelektrophorese zu überprüfen. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 4 µl *E*-PAP gestartet und bei 37°C für 1 h inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Aufreinigung der synthetisierten cRNA mit dem *MEGAclean Kit* (Ambion). Es wurden 100 µl der cRNA mit 350 µl der *Binding Solution* und 250 µl 100 %-igem Ethanol gemischt und auf den Filter des *Collection Tube* pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 12.900 *g* für 1 min, wurde der Durchfluß verworfen und zweimalig mit 500 µl *Wash Solution* gewaschen und jeweils zentrifugiert (12.900 *g*, 1 min). Dann wurden die Filter durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (12.900 *g*, 30 s) getrocknet und in neue *Elution Tubes* überführt. Für die Elution der cRNA wurden 50 µl der *Elution Solution* auf 95°C vorgewärmt, auf den Filter gegeben und zentrifugiert (12.900 *g*, 1 min). Dieser Schritt wurde für eine bessere Ausbeute nochmals wiederholt. 2 µl der cRNA wurden für die Konzentrationsbestimmung eingesetzt (3.1.6) und 0,5 µl der cRNA wurden mit 1 µl 6 x *Loading Dye* und 5 µl ddH₂O auf einem Agarosegel überprüft (3.2.1). Die cRNA wurde auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und bei -80°C in 5 µl Aliquots bis zur Verwendung gelagert.

3.13.5 Entnahme und Aufbereitung der Oozyten

Für die Entnahme der Oozyten wurden die weiblichen *X. laevis* Frösche zunächst im Kühlschrank für ca. 15-30 min gekühlt. Anschließend wurden die Tiere für 30-45 min in Eiswasser gesetzt wobei darauf geachtet wurde, dass die Nasenlöcher des Frosches über dem Wasserspiegel lagen, um ein Ertrinken zu verhindern. Sobald die Tiere ohne reflexartige Abwehrbewegungen auf den Rücken gelegt werden konnten, wurde das Gehirn mit einer Stanze mechanisch zerstört und mittels einer Metallsonde die *Medulla spinalis* sondiert. Die Haut über dem Abdomen wurde in der Medianen mit einem Skalpell durchtrennt und die darunterliegende Muskelschicht mit einer Metzenbaumschere stumpf präpariert. Die Ovarien wurden dann mit einer Pinzette entnommen und in OR-2 Puffer enthaltende 50 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. Als Vorbereitung für die Injektion der Oozyten wurde zunächst die schützende Follikelschicht der Oozyten mit einer Kollagenase Typ D (SERVA) verdaut. Damit die Kollagenase ihren Wirkort besser erreichen konnte,

wurden die Ovarien mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette in kleine Ovarläppchen zerteilt und in einer Petrischale mit Kollagenase enthaltendem OR-2 Puffer (4 mg Kollagenase/10 ml OR-2 Puffer) über Nacht für ca. 18 h inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Oozyten dreimal mit OR-2 Puffer gewaschen, 10 min in OR-2 Puffer inkubiert und danach dreimal mit modifizierter Barth's Lösung gewaschen. Für die Ergebnisse der Experimente war die Qualität der Oozyten ausschlaggebend. Deshalb wurden für die Injektion nur Oozyten der Reifestadien 5 und 6 selektioniert. Zusätzlich wurde nach folgenden Kriterien ausgewählt: ein guter Turgor, eine glatte Oberfläche ohne Verfärbungen und scharfe Abgrenzung des animalen, schwarzen Pols vom vegetativen, weißen Pol.

3.13.6 Mikroinjektion der cRNA

Für die Mikroinjektion wurden Glaskapillaren mit einem Kapillarenpuller selbst gezogen. Die Spitze der Kapillare wurde mit einem Skalpell gekappt, sodass die Öffnung einen Durchmesser von ca. 10 µm besaß. Die Kapillare wurde dann über eine feine Kanüle und eine 2 ml Spritze mit Mineralöl gefüllt und auf den Kolben der elektrischen Nanoliterpumpe geschraubt. Dieser Kolben wurde dann in einen Mikromanipulator eingespannt. Nach mehrfachem Spülen der Kapillare mit RNase-freiem Wasser wurden 5 µl (0,1 µg/µl) der synthetisierten cRNA (3.13.4) aufgezogen. Die selektionierten Oozyten wurden in modifizierter Barth's Lösung entweder auf ein feinmaschiges Netz oder auf eine sogenannte Treppe gelegt, mit der Kapillare am vegetativen Pol eingestochen und in jede Oozyte ein Volumen von 46 nl (4,6 ng) cRNA oder aber ddH₂O als Negativkontrolle injiziert. Die injizierten Oozyten wurden über drei Tage in modifizierter Barth's Lösung mit 0,1 % Gentamicin in 48-well Platten einzeln (eine Oozyte/well), bei ca. 18°C inkubiert. Der Puffer wurde täglich gewechselt und beschädigte, geplatzte oder verfärbte Oozyten wurden entfernt.

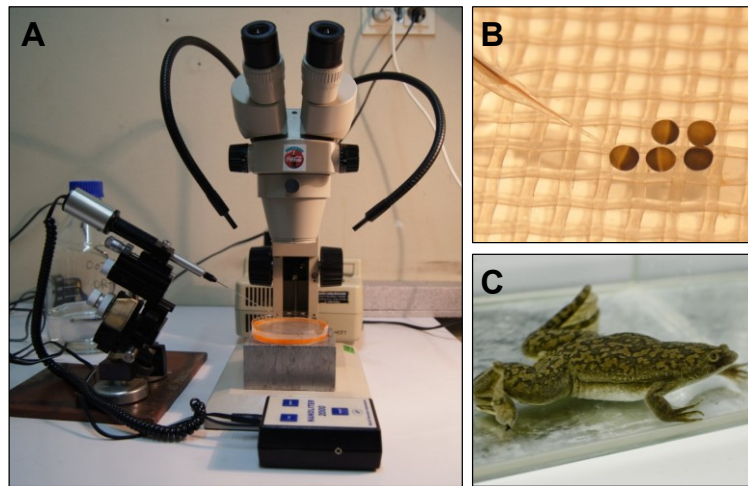


Abb. 3.6: Mikroinjektion in *X. laevis* Oozyten

(A) Für die Mikroinjektion wurde eine Lupe mit 40-facher Vergrößerung, eine Nanoliterpumpe mit Injektionsapparat, eine Schwanenhalslampe und ein feinmaschiges Netz (B) verwendet. Die Injektion erfolgte immer in den vegetativen, weißen Pol der Oozyten. (C) Ein ausgewachsenes *X. laevis* Weibchen (Foto: Dipl. Biol. Katrin Richter, Institut für Tierphysiologie, JLU Giessen).

3.13.7 Transportmessung an *X. laevis* Oozyten

Am Tag der Messung erfolgte eine letzte Selektion der vitalen Oozyten. Anschließend wurden diese mit Transportpuffer (Na^+ -haltig, Na^+ -frei) gewaschen und in Gruppen von 15 Oozyten pro well in 24-well Schalen sortiert. Die Messlösung bestand zu einem gewissen Anteil aus radioaktiv-markierter Substanz, wobei die erwünschte Konzentration durch Zugabe von unmarkierter Substanz eingestellt wurde. Die Transportmessung wurde durch Zugabe von 500 μl Messlösung pro well gestartet und bei Raumtemperatur für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Die Aufnahme wurde anschließend durch dreimaliges Waschen der Oozyten mit jeweils 1 ml eiskaltem Transportpuffer gestoppt. Die Oozyten wurden vereinzelt und jede Oozyte in einem Minivial mit 500 μl 10 % SDS lysiert (1 h, RT). Nach der Zugabe von 3 ml Szintillatoröl wurden die Minivials gevortext und die aufgenommene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler detektiert.

3.13.8 Auswertung der Experimente

In einer Excel-Tabelle wurden die Ergebnisse aus der Flüssigszintillation zusammengefasst und die Substrataufnahme in die Oozyte pro Zeiteinheit (pmol/Oozyte/min) errechnet. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Programm *GraphPad Prism 4* erstellt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm S.D. dargestellt. Bei unabhängigen Stichproben wurde der ungepaarte *t-Test* verwendet, bei Mehrfachvergleichen eine *One-way ANOVA* mit einem *Bonferroni's Multiple Comparison Test* oder eine *Two-way ANOVA* mit einem *Tukey's Multiple Comparison Test*.

3.14 Methoden zur Arbeit mit der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus

3.14.1 Maushaltung

Die verwendeten Mausstämme wurden zu Beginn der Arbeit in der SPF-Anlage (spezifisch pathogenfrei) des Zentralen Tierlabors der Justus-Liebig Universität Gießen in Typ II L Makrolon-Käfigen (Fa. Tecniplast, Hohenpeißenberg) in IVC-Systemgestellen Modell BlueLine gehalten. Später erfolgte die Umsiedelung in die neue SPF-Tierhaltungsanlage des Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg (BFS). Die Haltung erfolgte hier in Typ GM 500 Käfigen mit statischer Filterhaube (Fa. Tecniplast, Hohenpeißenberg), welche zusätzlich mit Maushäusern angereichert wurden. Die Einstreu bestand aus autoklavierten Spänen (WH-Grade 6) (LasVendi, Soest) und wurde einmal in der Woche gewechselt. Die Fütterung erfolgte mit Haltungsfutter Altromin1324TPF (Altromin, Lage) und die Wasserversorgung erfolgte *ad libitum*. Pro Käfig wurden maximal 6 Mäuse gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten klimatischen Bedingungen. Die Raumtemperatur lag bei 20°C +/- 2°C bei einer relativen Luftfeuchte von 55 % +/- 10 %. Die Räume wurden mit einer Luftwechselrate von 20 pro Stunde belüftet. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Die Tiere wurden unter SPF-Status gehalten und ihr Hygienestatus nach den aktuellen Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* („FELASA“) in den empfohlenen Intervallen untersucht.

3.14.2 Entnahme der Biopsien

Im Alter von drei bis vier Wochen wurden die Jungtiere von ihren Müttern abgesetzt. Dabei wurden sie von den Tierpflegern des Zentralen Tierlabors der Justus-Liebig-Universität durch eine Ohrstanzung markiert und unter Narkose Schwanzbiopsien genommen.

3.14.3 Identifikation der Tiere

Die Identifikation der Tiere erfolgte durch eine Markierung am Ohr der Maus. Ab diesem Zeitpunkt wurde die jeweilige Maus mit einer fortlaufenden Nummer bezeichnet und im Datenbanksystem *TierBase* aufgeführt. In dieser Datenbank wurden alle relevanten Informationen wie zum Beispiel die Wurfgröße, Geburtsdatum, Genotyp und Geschlecht der Tiere erfasst.

3.14.4 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe

Die für die Genotypisierung benötigte DNA konnte mithilfe des *DNeasy Blood& Tissue Kits* (Qiagen) aus Schwanzbiopsien (3-5 mm) oder aus Ohrbiopsien (1-2 Gewebeproben) isoliert werden. Bis zur Verarbeitung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Das Gewebe wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 180 µl *ATL* Lysepuffer und 20 µl Proteinase K versetzt und im Wasserbad bei 56 °C über Nacht verdaut. Am Tag darauf wurde das Lysat kräftig gemischt (15 s) und 200 µl *AL* Puffer und 200 µl Ethanol zugegeben. Nach weiterem Vortexen wurde das Gemisch auf eine *DNeasy Mini Spin* Säule gegeben und zentrifugiert (6.000 g, 1 min). Die Säule wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 500 µl *AW1* Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (6.000 g, 1 min). Danach wurde die Säule nochmals durch Zugabe von 500 µl *AW2* Puffer gewaschen und die Säulenmembran durch Zentrifugation (20.000 g, 3 min) getrocknet. Für die Elution der DNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für eine Minute bei RT mit 200 µl *AE* Puffer inkubiert und ein letztes Mal zentrifugiert (6.000 g, 1 min). Von diesem Eluat wurden 2,5 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt.

3.14.5 „Schnelle“ Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe

Die Rückkreuzung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus auf den genetischen Hintergrund der *C57BL/6* Maus erforderte die Genotypisierung einer sehr hohen Anzahl an Mäusen. Deshalb wurde das weniger zeitintensive und kostengünstigere *HotSHOT* DNA-Isolierungsprotokoll (Truett et al. 2000) an unserem Institut etabliert. Die Schwanz- und Ohrbiopsien wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 75 µl des Lyse-Puffers (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) über den Zeitraum von 45 min in einem Thermomixer bei 95°C inkubiert. Danach wurden die Proben für einige Minuten auf Eis gestellt und 75 µl des Neutralisationspuffer (40 mM Tris-HCl, pH 5) hinzu pipettiert. Unabhängig von der Konzentration wurden jeweils 2 µl der DNA in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

3.14.6 Tötung der Versuchstiere

Zur histologischen Probengewinnung wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

3.14.7 Nomenklatur der B6.129S5- *Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Für die Arbeit mit Knockout-Mäusen ist es sehr wichtig, ein einheitliches, standardisiertes Nomenklatursystem zu verwenden. Die Schreibweise beinhaltet spezifische Informationen der Mauslinie und lässt eine genaue Identifikation zu. Zuständig hierfür ist das *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice*.

<u>B6;129S5- <i>Slc10a4</i>^{tm1Lex}</u>	
B6 :	Rezipientenstamm
129S5 :	Donorstamm (der embryonalen Stammzelllinie)
;	genetischer Mischhintergrund
.	beginnend kongen (N5), oder vollständig kongen (N10)
<i>Slc10a4</i> :	Genort
<i>tm1</i>	„targeted mutation“, Konstrukt 1
<i>Lex</i> :	Labor Code des Ursprungslabor, Lexicon

Abb. 3.7: Erklärung der Nomenklatur der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Als erstes steht die Abkürzung des Rezipientenstamms *C57BL/6* (B6), gefolgt von der Abkürzung des Donorstammes *129S5SvEvBrd* (129S5) der embryonalen Stammzelle. Getrennt werden diese beiden Abkürzungen entweder durch ein Semikolon, wenn es sich um einen genetischen Mischhintergrund handelt, oder durch einen Punkt, sobald die Rückkreuzung die 5. Generation überschreitet. Kursiv geschrieben wird dann der Genort, die englische Bezeichnung der „gezielten Mutation“ und der Labor Code des Labors, in welchem die Knockout-Maus generiert wurde. Diese werden zusätzlich hochgestellt.

3.14.8 Generierung der B6.129S5- *Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Die B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus wurde im *Texas A&M Institute for Genomic Medicine* (TIGM) generiert. Um die *in vivo* Funktion eines Gens zu erforschen, wird häufig das Modell der Knockout-Maus verwendet. Bei diesen ist ein spezifisches Gen deletiert und man beobachtet die Auswirkung des Genverlustes auf den Gesamtorganismus der Maus. Die Methode, mit der man ein spezifisches Gen gezielt verändern kann, wird als *gene targeting* bezeichnet. Mittels homologer Rekombination wird ein auf einem Plasmid-basierender Zielvektor (Abb. 3.9), welcher die modifizierte Gensequenz beinhaltet, in das Zielgen des Genoms muriner, multipotenter, embryonaler Stammzellen integriert. Dadurch wird die ursprüngliche Gensequenz zerstört und es wird kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet. Für die Gewinnung embryonaler Stammzellen wurde der Inzuchtstamm *129S5SvEvBrd* verwendet. Die embryonalen Stammzellen entwickelten eine Resistenz gegen Neomycin wenn die Integration des Zielvektors erfolgreich verlaufen war und konnten dadurch selektioniert werden. Die veränderten embryonalen Stammzellen wurden dann in

Blastozysten von Mäusen des Inzuchtstammes *C57BL/6* injiziert. Danach folgte die Implantation dieser Blastozysten in den Uterus von pseudograviden Ammenmäusen. Die Nachkommen waren Chimären aus den Inzuchtstämmen *129S5SvEvBrd* und *C57BL/6* und wurden als F0-Generation bezeichnet. Diese Chimären der F0-Generation wurden mit *C57BL/6* Mäusen verpaart. Wenn sich die veränderten embryonalen Stammzellen zu Keimbahnzellen entwickelt hatten, trugen die nachfolgende F1-Generation das Transgen heterozygot.

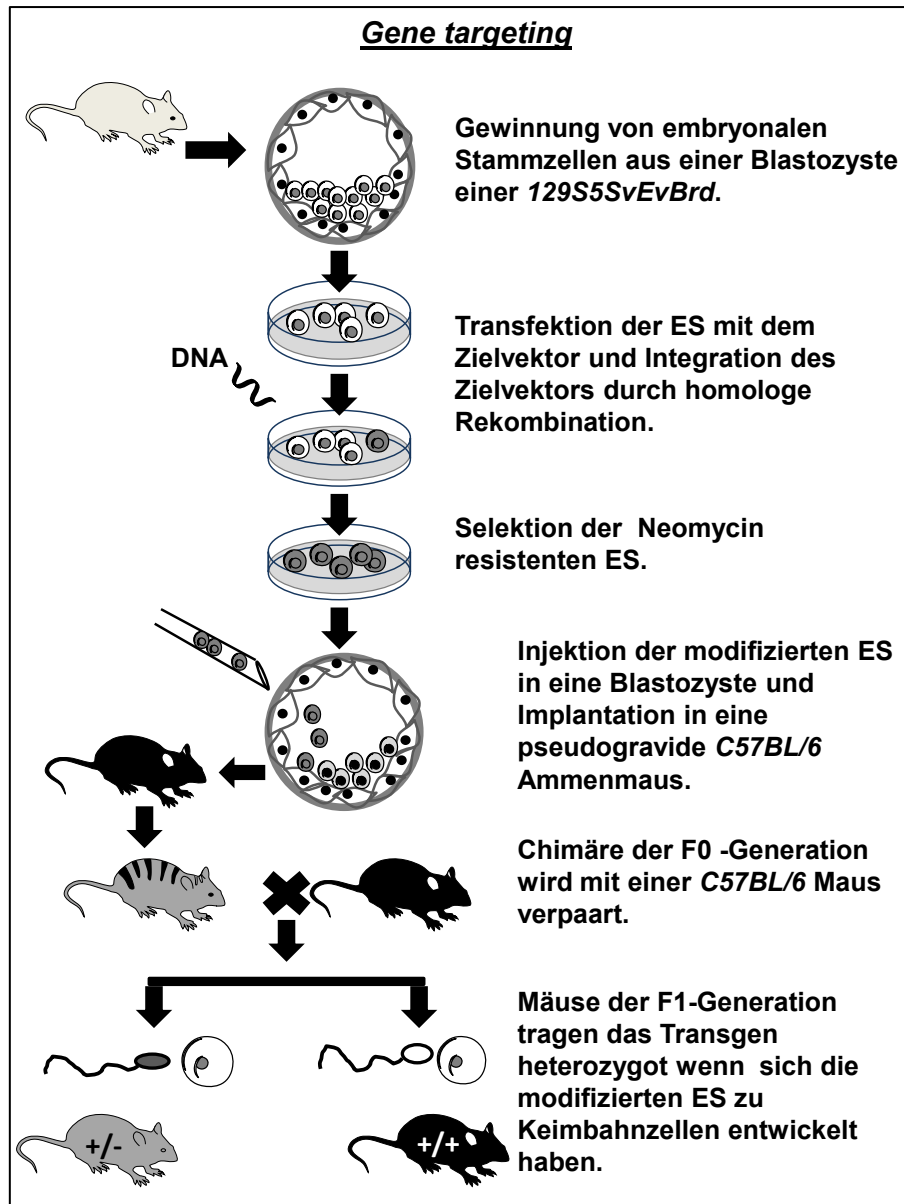


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Generierung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Vereinfachte schematische Darstellung der Generierung einer Knockout-Maus mittels *gene targeting*. Die B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus wurde im Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM) generiert.

3.14.9 Zielvektor TIGM

Für die Generierung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus wurde von TIGM ein Zielvektor für die Transfektion der embryonalen Stammzellen konstruiert. Er enthält lange Bereiche, welche zu dem Zielgen homolog sind und Bereiche modifizierter, fremder DNA (inklusive einer Neomycin-Selektionskassette) welche zu einer Deletion des Zielgens führen.

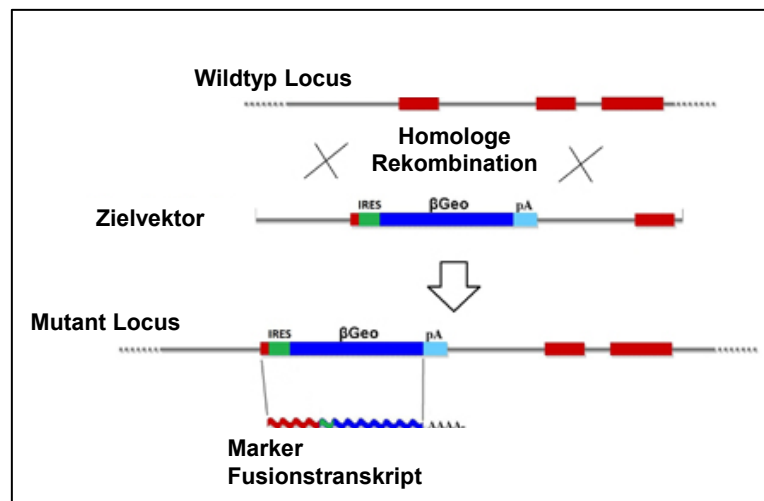


Abb. 3.9: Schema des von TIGM verwendeten Zielvektors

Der Zielvektor enthält eine „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES), einen β-geo Marker und eine Poly-A Sequenz. Der β-geo Marker ist ein funktionelles Fusionsprotein zwischen der β-Galactosidase und einem Neomycin Resistenzgen. Eine erfolgreiche homologe Rekombination in den embryonalen Stammzellen führt zu einer Resistenz gegen Neomycin (modifizierte Abb., <http://www.tigm.org/technologies/>).

3.14.10 Rückkreuzung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Der genetische Hintergrund eines Inzuchtstammes ist standardisiert und definiert. Allerdings gibt es bereits zwischen den verschiedenen Inzuchtstämmen große phänotypische Abweichungen. Das Ziel der Rückkreuzung ist deshalb die Herstellung eines kongenen Stammes, der sich nur in einem einzigen Allel, dem modifizierten Allel, unterscheidet. Nur dann ist es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob ein beschriebener Phänotyp auf ein einzelnes Gen zurückzuführen ist, oder eventuell auf einen gemischten genetischen Hintergrund. Die B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus der F1-Generation trägt das deletierte Gen heterozygot, ist aber gleichzeitig eine Chimäre aus zwei unterschiedlichen Inzuchtstämmen, dem 129S5SvEvBrd und dem C57BL/6 Inzuchtstamm. Bei einer Rückkreuzung werden die Mäuse in jeder Generation mittels PCR-Reaktion genotypisiert und die Mäuse ausgewählt, welche das deletierte Gen heterozygot tragen, um sie anschließend mit homozygoten Mäusen des Rezipientenstammes zu verpaaren (Abb. 3.10). Als Rezipientenstamm wurde für die B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus der

C57BL/6NTac (Taconic, Europe) Inzuchtstamm ausgewählt. Das ist ein kommerziell erhältlicher Standard-Inzuchtstamm, der sehr häufig als genetischer Hintergrund für die Rückkreuzung von Knockout-Mäusen verwendet wird. Er zeigt mittlere Werte bei den meisten phänotypischen Verhaltensanalysen und wurde bereits in einer großen Anzahl von Verhaltensstudien verwendet (Crawley 1999). Außerdem sind die *C57BL/6* Mäuse relativ langlebig und besitzen gute Zuchteigenschaften.

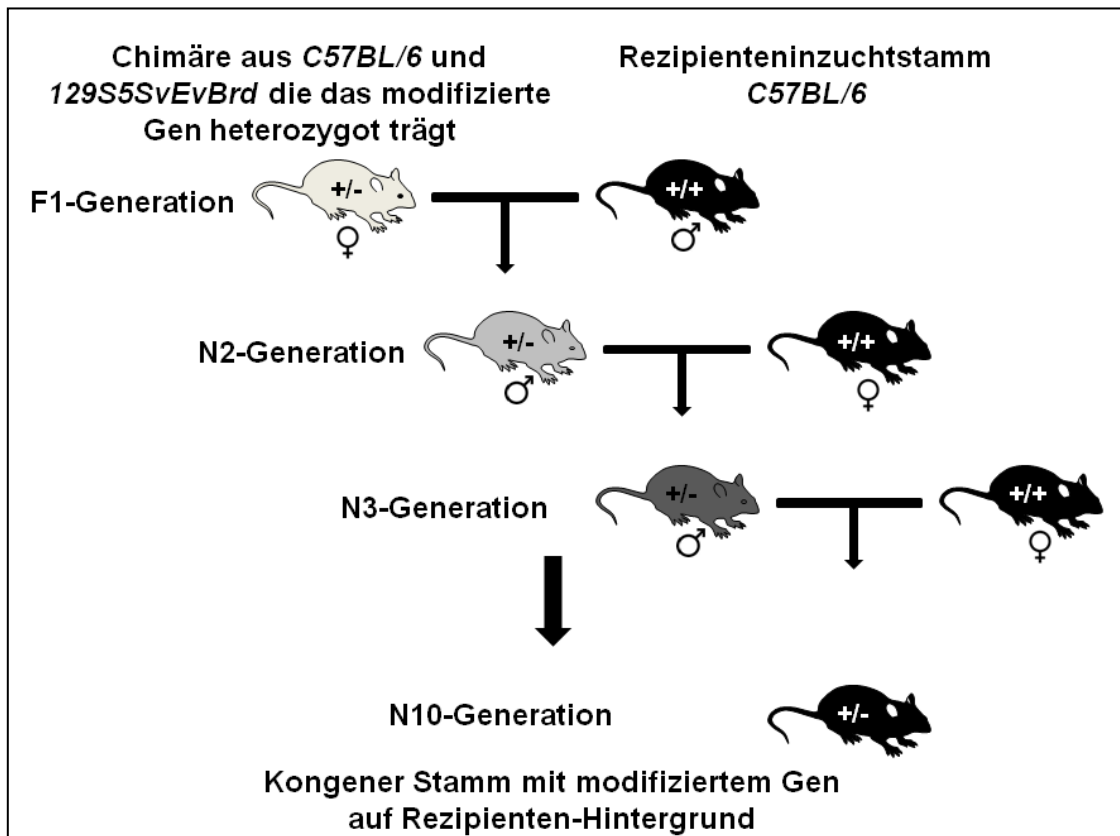


Abb. 3.10: Konventionelles Rückkreuzungsschema

Die Zucht eines kongenen Stammes erfolgt durch Verdrängung des Donorgenomanteils zugunsten des Rezipientenstammes. Ein weibliches Trägartier wird mit einem *C57BL/6* Männchen verpaart. Dadurch tragen alle männlichen Nachkommen das Y-Chromosom des Rezipientenstammes. Dann werden männliche Trägartiere ausgewählt und mit *C57BL/6* Weibchen verpaart, um das X-Chromosom und die mitochondriale DNA der *C57BL/6* im Genom des kongenen Stammes zu verankern.

In der konventionellen Rückkreuzung wird über 10 Generationen rückgekreuzt. Der Zeitaufwand dafür liegt bei zwei bis drei Jahren.

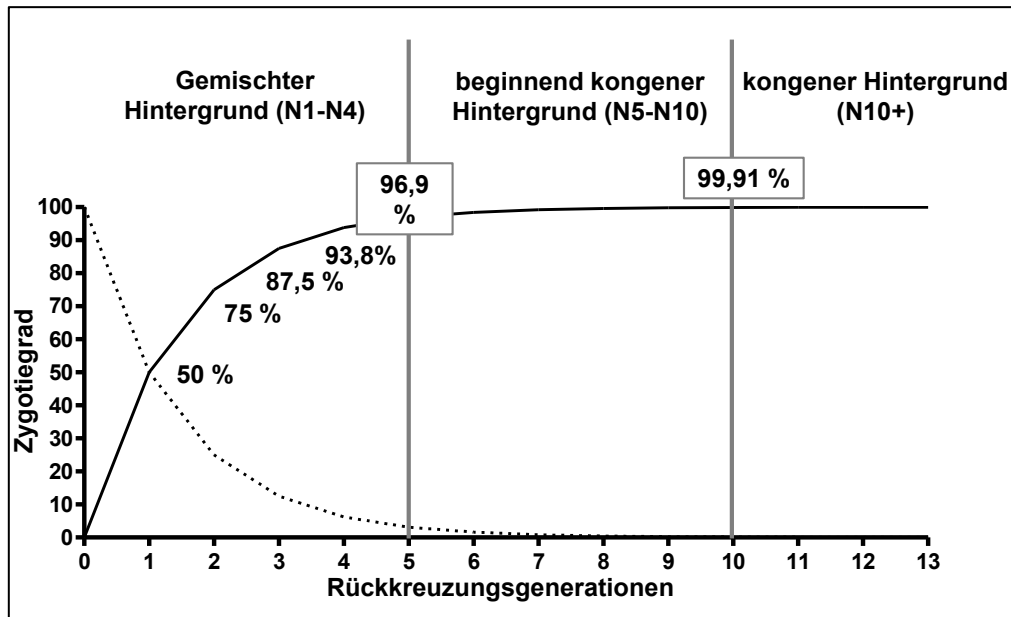


Abb. 3.11: Zygotiegrad der Rückkreuzungsgenerationen

Im Verlauf einer Rückkreuzung nimmt die Homozygotie (durchgezogene Linie) des zu Beginn noch gemischten genetischen Hintergrundes zu und die Heterozygotie (gestrichelte Linie) ab. Die Genomanteile des 129S5SvEvBrd Inzuchtstammes, die nicht mit dem selektierten Genort chromosomal gekoppelt sind, werden pro Generation durch die C57BL/6 Rezipientenstammanteile um theoretische 50 % verdrängt.

Der prozentuale Anteil des Rezipientenstammes ist ausschlaggebend für die Bezeichnung der Mauslinie (Abb. 3.11). Bis zur vierten Rückkreuzungsgeneration (N 4) wird von einem „gemischten Hintergrund“ gesprochen, ab der 5. Generation besitzt die Mauslinie einen „beginnend kongenen Hintergrund“ und ab der 10. Generation einen „kongenen Hintergrund“. In welchem dieser Rückkreuzungsstadien sich eine Mauslinie befindet ist bereits an ihrer Nomenklatur zu erkennen (Kap. 3.14.7).

3.14.11 „Speed Congenics“-beschleunigte Rückkreuzung

Um die Generierung eines kongenen Stammes zu beschleunigen, wurde ein Marker-assistiertes Selektionsprotokoll (MASP) bei Taconic (New York, USA) durchgeführt, das sogenannte „Speed Congenics“. Die Charakterisierung der Nachkommen basierte auf der genomweiten Analyse stammspezifischer genetischer Marker, die Polymorphismen zwischen den für die Herstellung der Chimäre verwendeten Inzuchtstämmen (129S5SvEvBrd, C57BL/6NTac) aufwiesen. Mit dem GENCON-Panel 4A 1449 Marker Single Nukleotide Polymorphism (SNP) Panel wurden die Nachkommen bestimmt, die an den Loci ohne Kopplung zum modifizierten Allel den prozentual höchsten Anteil des genetischen Hintergrundes des Rezipientenstammes (C57BL/6NTac) besaßen und diese für die weitere Zucht verwendet. Gleichzeitig wurden die gekoppelten Bereiche die direkt neben dem modifizierten Gen liegen überprüft und die Tiere bevorzugt, welche einen hohen

C57BL/6NTac Charakter aufwiesen. Diese Selektion wurde ab der Generation N2 durchgeführt. In jeder Generation wurden zwei ausgewählte, heterozygote Männchen mit jeweils vier *C57BL/6NTac* Weibchen verpaart, um eine möglichst große Anzahl an Nachkommen pro Generation zu generieren. Die männlichen Tiere wurden genotypisiert und 0,5-1,0 cm große Schwanzbiopsien der heterozygoten Tiere in 70 % Ethanol zu Taconic zur weiteren Analyse verschickt. Ein Rezipientenstammanteil von 99,9 % kann mit einer beschleunigten Rückkreuzung bereits nach 5-7 Rückkreuzungsgenerationen (Generationsdauer Maus 10-14 Wochen) und damit in der Regel nach 1,5 Jahren erreicht werden. Die Vorteile liegen folglich in einer bis zu 50 % reduzierten Rückkreuzungszeit, einer reduzierten Generationenzahl, reduzierten Kosten und natürlich, im Hinblick auf den Tierschutz, einer dezimierten Anzahl verwendeter Versuchstiere.

.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzvergleich von SLC10A4 mit anderen Spezies

Das *SLC10A4*-Gen des Menschen ist auf dem Chromosom 4p11 lokalisiert und besitzt eine Gesamtlänge von 5,85 kb. Das *full-length* Transkript besteht aus 2118 bp (GenBank NM_152679.3) mit einem 119 bp langen 5'UTR und einem 585 bp langen 3'-untranslatierten Bereich. Die kodierende Nukleotidsequenz von 1314 bp wird in das SLC10A4-Protein (GenBank Eintrag NP_689892.1) umgeschrieben, welches aus 437 Aminosäuren besteht und ein kalkuliertes Molekulargewicht von 46,5 kDa besitzt. Das mRNA-Transkript setzt sich aus drei Exonen mit Längen von 809, 211 und 1098 bp zusammen. Bis dato wurden zahlreiche Orthologe des SLC10A4-Transkriptes in verschiedenen Spezies identifiziert. Die Daten wurden experimentell verifiziert (Tab. 1) oder durch bioinformatische Analysen errechnet (s. Anhang (Tab. 9.1)).

Tab. 4.1: Sequenzen experimentell ermittelter SLC10A4-Transkripte verschiedener Spezies

Spezies	Accession-No. Protein	Accession-No. Nucleotid	Proteinlänge (AS)	Cds (bp)	Chro- som
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	NP_689892.1	NM_152679.3	437	1314	4p11
<i>Mus musculus</i> (Hausmaus)	NP_775579.2	NM_173403.2	437	1314	5
<i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte)	NP_001008555.1	NM_001008555.1	437	1314	14
<i>Bos taurus</i> (Hausrind)	NP_001071493.1	NM_001078025.1	448	1347	6
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	NP_001038268.1	NM_001044803	259	1019	20

Das SLC10A4-Protein zeigt die höchste Sequenzidentität mit den Slc10a4-Proteinen der Menschenaffen *Gorilla gorilla gorilla* 99,8 % (XP_004038695.1), *Pongo abelii* 99,3 % (XP_002814774.1) und *Nomascus leucogenys* 99,3 % (XP_003258477.1) (kalkuliert mit *DNAstar MegAlign*). Bei genauer Betrachtung weiterer, ausgewählter Säugetiere und Vögel variiert die Sequenzidentität der unterschiedlichen Arten zum humanen SLC10A4-Protein zwischen 61,3 % - 92,0 %. Ausgehend von diesen Berechnungen wurden die Abstammungsverhältnisse der einzelnen Arten rekonstruiert und in einem radialen phylogenetischen Baum illustriert (Abb. 4.1).

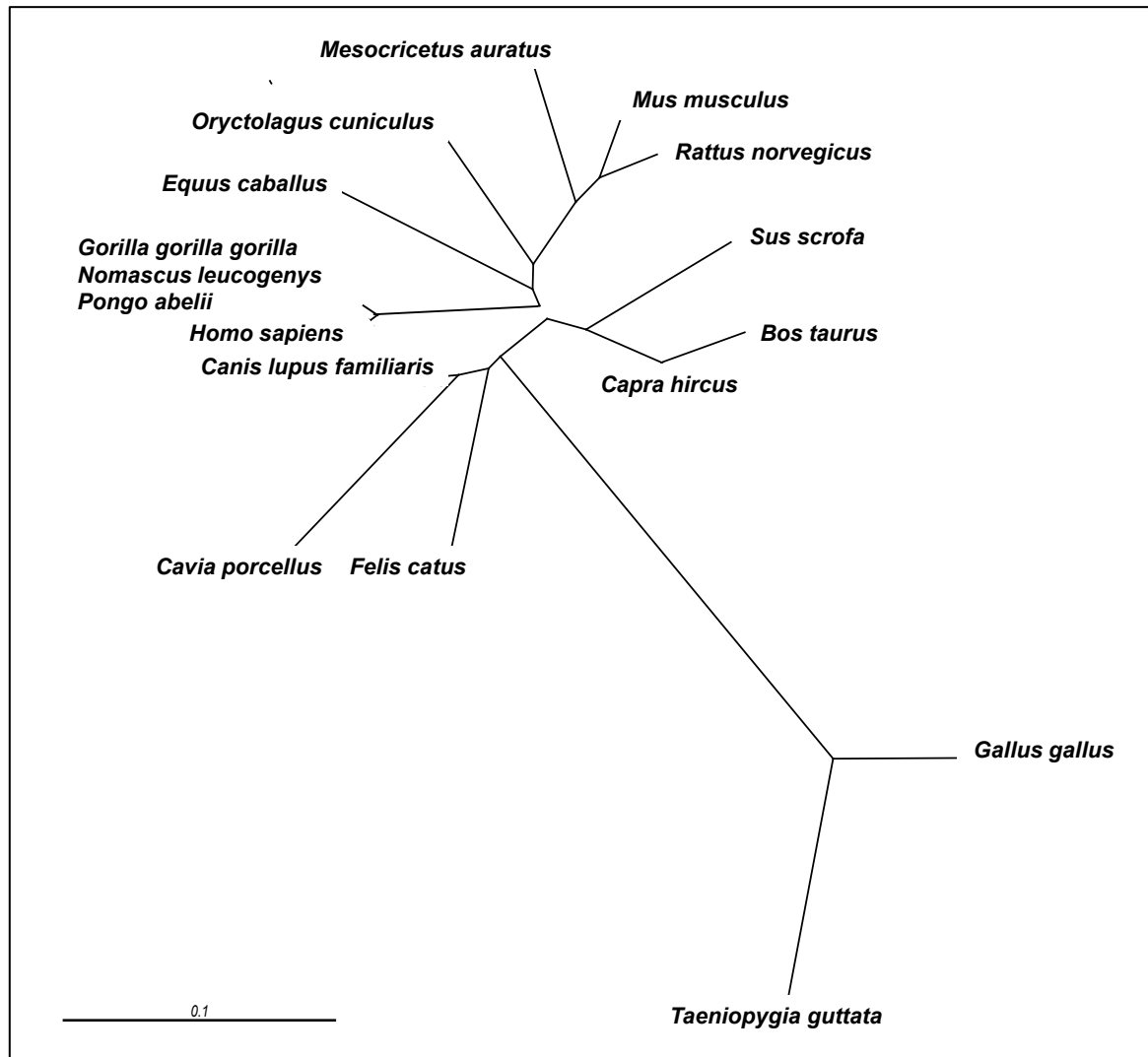


Abb. 4.1: Phylogenetischer, radialer Baum des SLC10A4-Proteins des Menschen und ausgewählter Tierarten

Die Verwandtschaftsnähe oder -ferne zwischen den unterschiedlichen Tierarten und dem humanen SLC10A4 lassen sich in einem phylogenetischen Baum darstellen. Proteinsequenzen, für welche eine hohe Sequenzidentität kalkuliert wurde, liegen in dieser Darstellung näher beieinander als Sequenzen mit einer hohen Divergenz.

Bei den Haustierrassen sind sich die Sequenzen der Nagetiere *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* (95,4 %) sehr ähnlich. Die Sequenzen mit der geringsten Sequenzidentität zu dem humanen SLC10A4-Protein sind die der Vogelarten *Gallus gallus* (68,2 %) und *Taeniopygia guttata* (61,3 %).

4.2 Klonierung der verwendeten Transporterkonstrukte

Die Funktion der SLC10-Familienmitglieder NTCP, ASBT und SOAT ist bekannt. Im Gegensatz dazu ist die Funktion von SLC10A4 noch nicht charakterisiert. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit SLC10A4 kloniert und die Transportfunktion in verschiedenen Expressionsmodellen getestet werden.

4.2.1 PCR-Amplifizierung, Klonierung und Subklonierung von SLC10A4

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung von SLC10A4 wurde ein humaner *full-length* cDNA TrueClone (SC123272, OriGene Technologies, Rockville) verwendet. Die kodierende Nukleotidsequenz wurde ohne Stopcodon mit den Primern P4-TA2-F und P4-TA2-R-OS mit dem *Expand Long Template PCR System* (Roche Applied Science) und einer Anlagerungstemperatur von 53°C durchgeführt. Die Elongation erfolgte bei 68°C und betrug in den ersten 10 Zyklen 2 min und wurde für weitere 25 Zyklen um 5 s pro Zyklus verlängert. Das aus 1409 bp bestehende PCR-Produkt wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Für die molekulare und funktionelle Untersuchung wurde SLC10A4 in zwei Expressionsvektoren für Säugetierzellen kloniert. Dafür wurde die Zielsequenz so in den Zielvektor einkloniert, dass das Startcodon des Leserahmens stromabwärts des CMV-Promotors des Vektors liegt und der komplette Leserahmen exklusive des Stopcodons *in frame* vor das C-terminale Tag (EmGFP oder V5-His) integriert wurde. Dies ermöglichte einerseits die Detektion des SLC10A4-Proteins für subzelluläre Lokalisationsstudien durch den immunzytologischen Nachweis (3.11.1, 3.11.2) der C-terminalen Tags und andererseits die Expression für funktionelle Studien in variierenden Expressionssystemen. Da die verwendete *Expand Long Template* Polymerase einen Adenin-Überhang am 3'-Ende generiert, konnte das PCR-Produkt direkt kloniert werden (3.4.1). Dafür wurde jeweils eine Ligation mit dem Vektor pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen) und mit pcDNA6.2/C-EmGFP/YFP TOPO (Invitrogen) in Bakterien transformiert, vermehrt und isoliert. Im Anschluß wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdaus die Plasmid-DNA identifiziert, welche das Insert in der richtigen Orientierung trägt (Abb. 4.2) und über Sequenzierung die Sequenz im Vergleich zur Acc. No. NM_152679.3 überprüft.

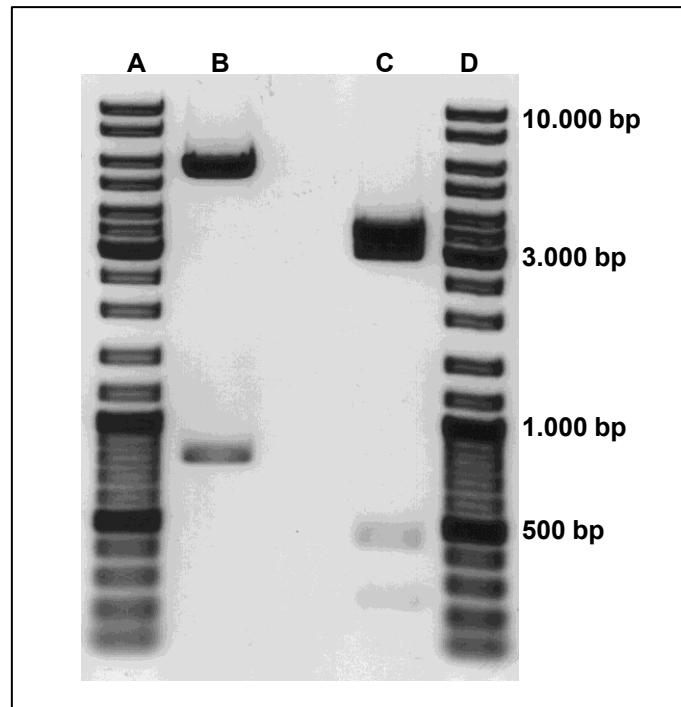


Abb. 4.2: Restriktionsanalyse des SLC10A4-Inserts im pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO-Plasmid und pcDNA6.2/C-EmGFP/YFP TOPO-Plasmid

Auf ein 1%-iges Agarosegel wurde der *GeneRuler DNA Ladder Mix* (**A, D**) aufgetragen. Das SLC10A4-Insert im pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO-Plasmid (**B**) wurde mit dem Restriktionsenzym *XbaI* an zwei Positionen geschnitten und es zeigten sich auf einem Agarosegel, bei der richtigen Orientierung des Inserts, DNA-Fragmente der Größen 5.711 bp und 791 bp. Das Enzym *NcoI* wurde für das SLC10A4-Insert im pcDNA6.2/C-EmGFP/YFP TOPO-Plasmid (**C**) verwendet und führte bei richtiger Orientierung zu einem Schnittmuster von 220 bp, 539 bp, 3.068 bp und 3.495 bp.

Anschließend wurde das SLC10A4-EmGFP-Fusionskonstrukt in den Vektor pcDNA5/FRT/TO-TOPO (Invitrogen) subkloniert, welcher eine kontrollierte Induktion der Proteinexpression ermöglichte. Dies sollte potenzielle toxische Effekte des EmGFP-Tags unter konstitutiver Expression verhindern. Weiterhin war dadurch eine stabile Integration in das Genom der Flp-In T-REx HEK293-Zellen (Invitrogen) möglich. Deshalb wurde das SLC10A4-Insert inklusive GFP-Tag mit den Primern P4-TA2-F und GFP-R amplifiziert. Dies erfolgte mit dem *GC-RICH PCR System* (Roche Applied Science) sowie einer Anlagerungstemperatur von 55°C und einer Elongationszeit von 2 min 15 s für die ersten 10 Zyklen und anschließend für weitere 30 Zyklen mit einer Verlängerung der Elongationszeit um 5 s pro Zyklus. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in den Vektor pcDNA5/FRT/TO-TOPO (Invitrogen) subkloniert, in Bakterien vervielfältigt, mit dem *Qiaex II Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgereinigt (3.1.4) und über Restriktionsverdau die Orientierung mit Hilfe des Enzyms *EcoRI* überprüft. Die korrekte Sequenz wurde anschließend mittels Sequenzierung überprüft.

4.2.2 PCR-Amplifizierung, Klonierung und Subklonierung der Kontrollen VACHT, VMAT2, DAT, CHT1 und SERT

Um zu untersuchen, ob SLC10A4 in unterschiedlichen Expressionsmodellen eine Transportfunktion über die Plasmamembran oder in vesikuläre Kompartimente besitzt, wurden als Positivkontrollen bereits charakterisierte Neurotransmittertransporter kloniert und vergleichend im jeweiligen Expressionsmodell gemessen. Dazu zählten der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACHT, SLC18A3), der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT2, SLC18A2), der Dopamintransporter (DAT, SLC6A3), der Cholintransporter (CHT1, SLC5A7) und der Serotonintransporter (SERT, SLC6A4). Die Klonierung erfolgte wie beim SLC10A4. Die verwendeten Polymerasen und Restriktionsenzyme wurden in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Volumina der PCR-Reaktionsansätze wurden jeweils nach den Angaben des Herstellers pipettiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer für den jeweiligen Transporter befinden sich im Materialteil (2.1.1).

Tab. 4.2: Polymerasen und Restriktionsenzyme für die Klonierung der Positivkontrollen

Transporter	Polymerase der Klonierung	Restriktions-enzym	Polymerase der Subklonierung	Restriktions-enzym
VACHT	<i>Expand Long Template PCR System</i>	<i>SacII</i> <i>SmaI</i>	<i>Expand Long Template PCR System</i>	<i>SacII</i>
VMAT2	<i>Expand Long Template PCR System</i>	<i>MluI</i>	<i>GC-RICH PCR System</i>	<i>MluI</i>
DAT	<i>Expand Long Template PCR System</i>	<i>BamHI</i> <i>Apal</i>	<i>GC-RICH PCR System</i>	<i>BamHI</i>
CHT1 *	<i>Expand High Fidelity Plus</i>	<i>KpnI</i>	<i>Fast Start High Fidelity</i>	<i>EcoRI</i>
SERT *	<i>Fast Start High Fidelity</i>	<i>BamHI</i>		

* wurde von Regina Leidolf und Dr. Barbara Döring kloniert.

Bei allen gewonnenen Plasmiden wurde die DNA sequenziert und mit den dazugehörigen bekannten Sequenzen der GenBank von VACHT (NM_003055), VMAT2 (NM_003054), DAT (NM_001044), CHT1 (NM_021815) und SERT (NM_001045) überprüft.

4.3 Expression in GripTite 293 MSR-Zellen

Für die funktionelle Charakterisierung von SLC10A4 musste zunächst ein geeignetes *in vitro* Expressionsmodell etabliert werden. Hierzu wurden SLC10A4 und die Neurotransmittertransporter VACHT, VMAT2, DAT, CHT1, SERT sowohl V5-His- als auch EmGFP-markiert transient in GripTite 293MSR-Zellen transfiziert (Kapitel 3.9.2) und mittels immunzytologischer Verfahren (Kapitel 3.11.1 + 3.11.2) nachgewiesen. Die V5-His-Konstrukte wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz (Abb. 4.3) und die EmGFP-Konstrukte wurden mit direkter Fluoreszenz (Abb. 4.4) sichtbar gemacht. Alle generierten Fusionsproteine ließen sich korrekt translatieren und waren in beiden Verfahren deutlich detektierbar.

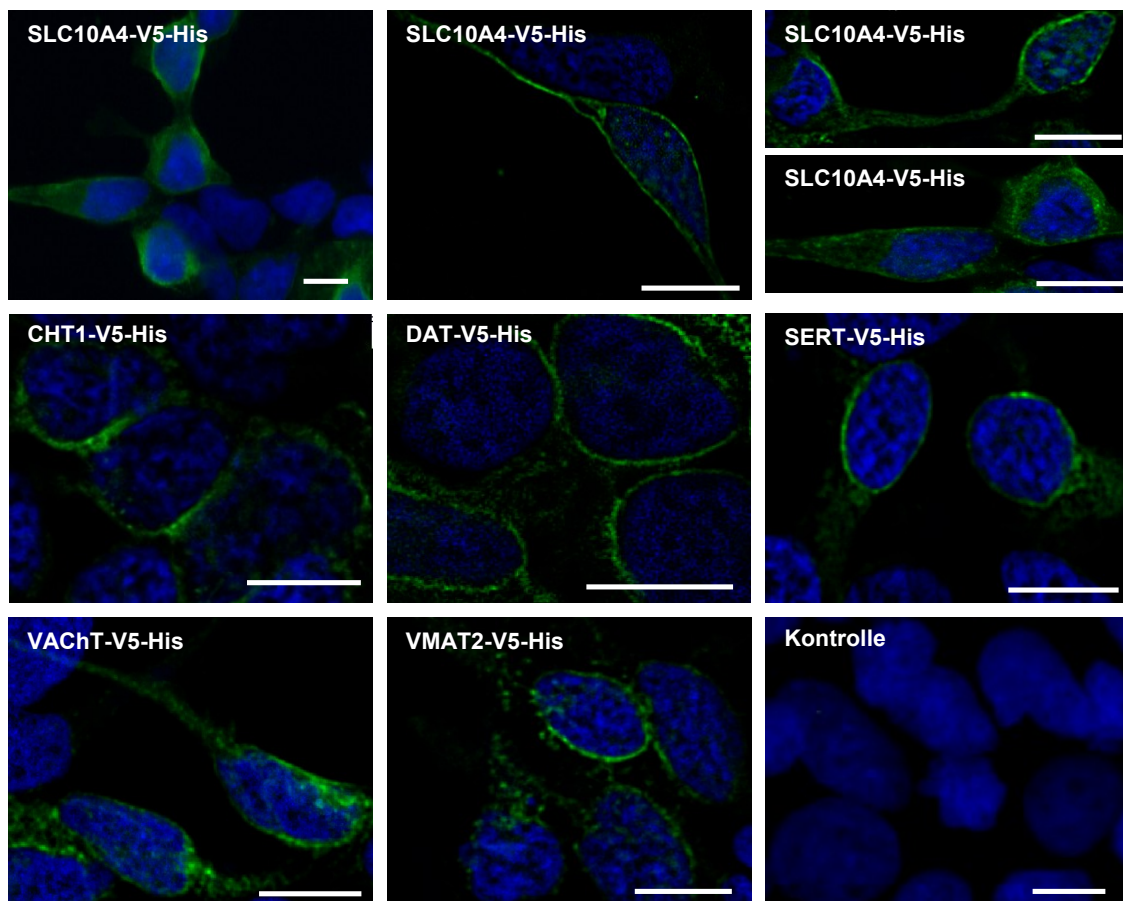


Abb. 4.3: Nachweis transient transfizierter SLC10A4-, CHT1-, DAT-, SERT-, VACHT- und VMAT2-V5-His-Fusionsproteine mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die SLC10A4-, CHT1-, DAT-, SERT-, VACHT- und VMAT2-V5-His-Konstrukte wurden transient in GripTite 293 MSR-Zellen transfiziert und anschließend 48 h kultiviert. Als Primärantikörper wurde der gegen das V5-His-Tag gerichtete monoklonale Maus anti-V5-His Antikörper (1:5000) verwendet. Der Alexa Fluor 488-gekoppelte Ziege anti-Maus Antikörper wurde als Sekundärantikörper (1:800) eingesetzt (grüne Färbung). Die Zellkerne wurden mit DAPI/Methanol (1:5000) angefärbt (blaue Färbung). Gezeigt wird jeweils ein Einzelbild eines Z-Stapels nach Bearbeitung mit der Software 3D Deconvolution. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte GripTite 293 MSR-Zellen. Maßstab 10 µm.

Die Fluoreszenzsignale der vesikulären Transporter VACHT-V5-His und VMAT2-V5-His konnten vor allem in intrazellulären Kompartimenten perinukleär und auch in langen Zellausläufern detektiert werden. Die membranständigen Transporter DAT-V5-His und SERT-V5-His wurden vor allem in der Plasmamembran lokalisiert. Die Expression von SLC10A4-V5-His hingegen ist nicht nur in intrazellulären Kompartimenten detektierbar, sondern zu einem geringeren Anteil auch in der Plasmamembran. Dieses Expressionsmuster gilt auch für CHT1-V5-His und wurde für diesen Transporter bereits in HEK293-Zellen beschrieben (Ribeiro et al. 2003).

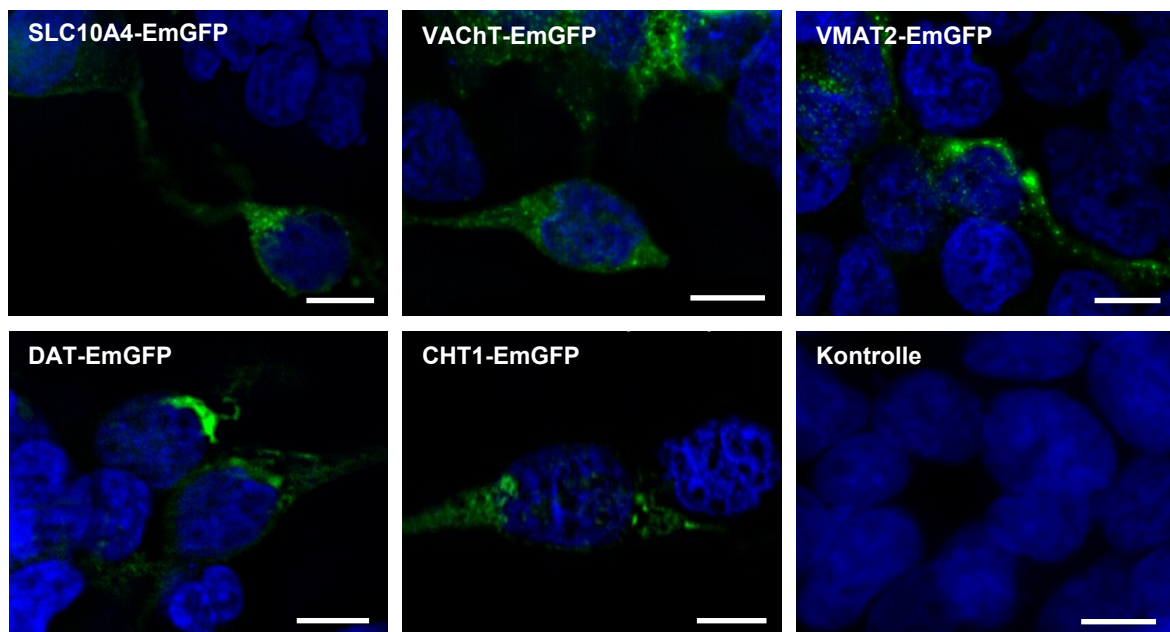


Abb. 4.4: Nachweis transient transfizierter SLC10A4-, CHT1-, DAT-, VACHT- und VMAT2-EmGFP-Fusionsproteine mittels direkter Fluoreszenz

Die SLC10A4-, CHT1-, DAT-, VACHT- und VMAT2-EmGFP-Konstrukte wurden transient in GripTite 293 MSR-Zellen transfiziert und anschließend 48 h kultiviert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte GripTite 293 MSR-Zellen. Die Fusionsproteine der genannten Transporter konnten dank der Eigenfluoreszenz des EmGFP-tags (grüne Färbung) mittels direkter Fluoreszenz dargestellt werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI/Methanol (1:5000) angefärbt (blaue Färbung). Gezeigt wird jeweils ein Einzelbild eines Z-Stapels nach Bearbeitung mit der Software 3D Deconvolution. Maßstab 10 µm.

Vergleichend zeigte sich für SLC10A4, VACHT, VMAT2 und CHT1 eine ähnliche subzelluläre Lokalisation der V5-His und der EmGFP-Konstrukte. Allerdings konnte der membranständige Transporter DAT nicht deutlich in der Plasmamembran detektiert werden. Zusätzlich ließ sich die Beobachtung machen, dass alle transient transfizierten EmGFP-Konstrukte scheinbar zur Aggregation neigten und das Sorting dieser Fusionsproteine dadurch eventuell gestört sein könnte.

4.4 Etablierung stabiler Zelllinien

Da die Ergebnisse der transienten Transfektion die Richtigkeit der Translation und der Sortierung der Fusionsproteine, zumindest für die V5-His- und einen Teil der EmGFP-Konstrukte, bestätigte, wurden für SLC10A4, VACHT, VMAT2, CHT1 und DAT stabile Zelllinien sowohl mit V5-His-Tag als auch EmGFP-Tag generiert (Kapitel 3.9.2). Dazu wurden die Konstrukte in Vektoren verwendet, welche eine *FRT site* besitzen und somit gerichtet und stabil in Flp-In T-REx HEK293-Zellen transfiziert werden konnten. Die Expression wurde auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Auch nach mehrmaligen Versuchen war die Generierung einer stabilen CHT1-Zelllinie nicht möglich.

4.4.1 Immunfluoreszenz der stabil transfizierten Flp-In T-REx HEK293-Zellen

Die zelluläre Lokalisation der stabil transfizierten Fusionsproteine war vergleichbar mit der Lokalisation der transient transfizierten Fusionsproteine (Abb. 4.5). Da die V5-His-Konstrukte eine gleichmäßigere Expression ohne Aggregatbildung zeigten, sollte der Fokus auf den Transportmessungen mit den V5-His-Konstrukten liegen. Alle Transportmessungen beschränkten sich folglich auf V5-His-Konstrukte, welche deshalb im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch mit dem Namen des jeweiligen Transporters bezeichnet werden.

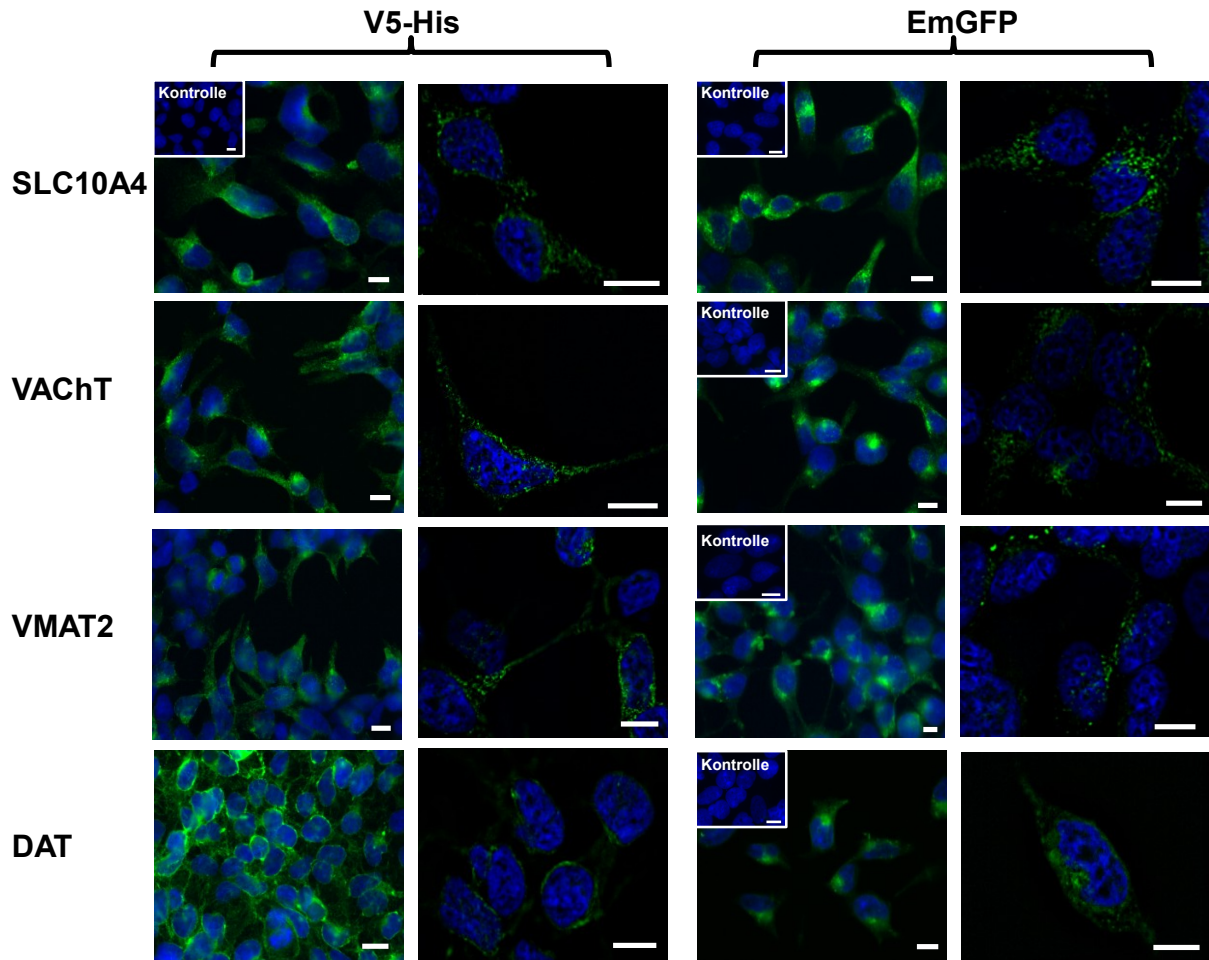


Abb. 4.5: Nachweis der SLC10A4-, VACHT-, VMAT2- und DAT-V5-His und -EmGFP-Fusionsproteine nach stabiler Transfektion mittels indirekter Immunfluoreszenz und direkter Fluoreszenz

Die SLC10A4-, VACHT-, VMAT2- und DAT-V5-His und -EmGFP-Konstrukte wurden stabil in Flp-In T-RExHEK293-Zellen transfiziert. Für den Nachweis der Fusionsproteine wurden die Zellen in 24-well Schalen auf Deckgläschen ausgesät. Bei der indirekten Immunfluoreszenz der Zelllinien mit V5-His-Tag wurde als Primärantikörper der gegen das V5-His-Tag gerichtete monoklonale Maus anti-V5-His Antikörper (1:5000) verwendet. Der Alexa Fluor 488-gekoppelte Ziege anti-Maus Antikörper wurde als Sekundärantikörper (1:800) eingesetzt (grüne Färbung). Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen. Für die direkte Fluoreszenz der Zelllinien mit GFP-Tag wurden diese mit Tetracyclin über drei Tage induziert. Als Kontrolle dienten nicht induzierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI/Methanol (1:5000) angefärbt (blaue Färbung). Gezeigt sind jeweils einfache Vergrößerungen (630-fach, linke Bilder) und Einzelbilder eines Z-Stapels nach Bearbeitung mit der Software 3D Deconvolution (rechte Bilder). Maßstab 10 µm.

4.4.2 Real-Time PCR

Parallel zu der Durchführung der stabilen Transfektionen wurden bereits die Aufnahmemessungen mit radioaktiv-markierten Substanzen an transient transfizierten Zellen über die intakte Zellmembran begonnen. Die plasmamembranständigen Positivkontrollen CHT1, DAT und SERT zeigten bereits in transienten Transfektionen sehr deutlich signifikante Aufnahmen ihres jeweiligen Substrates. Deshalb wurde nur die stabile Transfektion der vesikulären Konstrukte SLC10A4, VMAT2 und VACHT auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurden die SLC10A4-HEK293, VMAT2-HEK293 und VACHT-HEK293-Zellen kultiviert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann in die Real-Time PCR eingesetzt (Abb. 4.6). Dabei wurde die GAPDH-Expression als endogene Kontrolle verwendet.

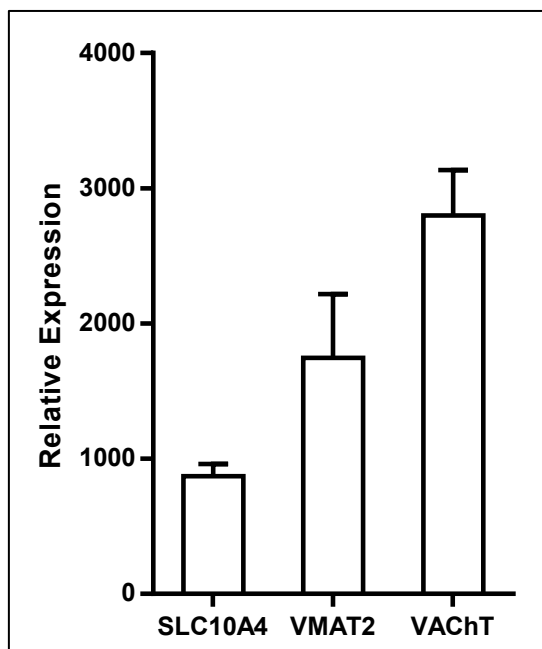


Abb. 4.6: Kontrolle der stabilen Flp-In T-REx HEK293-Zelllinien mittels quantitativer Real-Time PCR

Relative Expression der stabilen Transfektion von SLC10A4, VMAT2 und VACHT in Flp-In T-REx HEK293-Zellen, berechnet nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dargestellt ist die n-fache mRNA-Expression im Vergleich zur Ausgangszelllinie Flp-In T-REx HEK293.

Mit dieser Methode konnte die Stärke der Überexpression der Konstrukte nach der stabilen Transfektion im Vergleich zur Expression in der Ausgangszelllinie Flp-In T-REx HEK293 untersucht werden. Alle untersuchten stabilen Zelllinien zeigten eine starke Überexpression der stabil integrierten Konstrukte. SLC10A4 war in der stabilen SLC10A4-HEK293-Zelllinie ca. 900-fach überexprimiert und auch die stabil generierten Zelllinien von VMAT2 und VACHT zeigten mit Werten von ca. 1800-fach, respektive ca. 2800-fach ebenfalls eine deutliche Überexpression.

4.5 Funktionelle Charakterisierung von SLC10A4 in unterschiedlichen Expressionsmodellen

Für die funktionelle Charakterisierung von SLC10A4 wurden unterschiedliche Expressionsmodelle in Betracht gezogen. Wir verwendeten zwei bereits etablierte *in vitro* Zellmodelle für die Aufnahmemessungen. Um den Transport über eine intakte Plasmamembran darzustellen, wurden zum einen Aufnahmemessungen an intakten transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen oder stabil transfizierten Flp-In T-REx HEK293-Zellen und zum anderen Aufnahmemessungen an *X. laevis* Oozyten durchgeführt. Außerdem wurde in dieser Arbeit eine Methode zur Messung von Transportaktivitäten in intrazellulären Kompartimenten etabliert, welche an Zellen mit permeabilisierter Plasmamembran angewendet wurden.

4.5.1 Transportstudien an GripTite 293 MSR- und Flp-In T-REx HEK293-Zellen über die intakte Plasmamembran

Zu Beginn wurden die Transportstudien über die intakte Plasmamembran durchgeführt und die Neurotransmittertransporter DAT, CHT1 und SERT aufgrund ihrer Lokalisation in der Plasmamembran als Positivkontrollen verwendet. Um eine ähnliche Transportfunktion von SLC10A4 und CHT1 aufzuzeigen, wurden GripTite 293 MSR-Zellen transient mit SLC10A4 und CHT1 transfiziert und Aufnahmemessungen mit dem CHT1-Substrat Cholin durchgeführt. Die bereits beschriebene Na^+ -abhängige und Hemicholinium-3 sensitive Aufnahme von Cholin über den CHT1 (Ribeiro et al. 2003) konnte auch in unseren Experimenten sehr gut dargestellt werden. Im Vergleich zum CHT1 jedoch war für SLC10A4 kein Transport für die Substanz Cholin nachweisbar (Abb. 4.7).

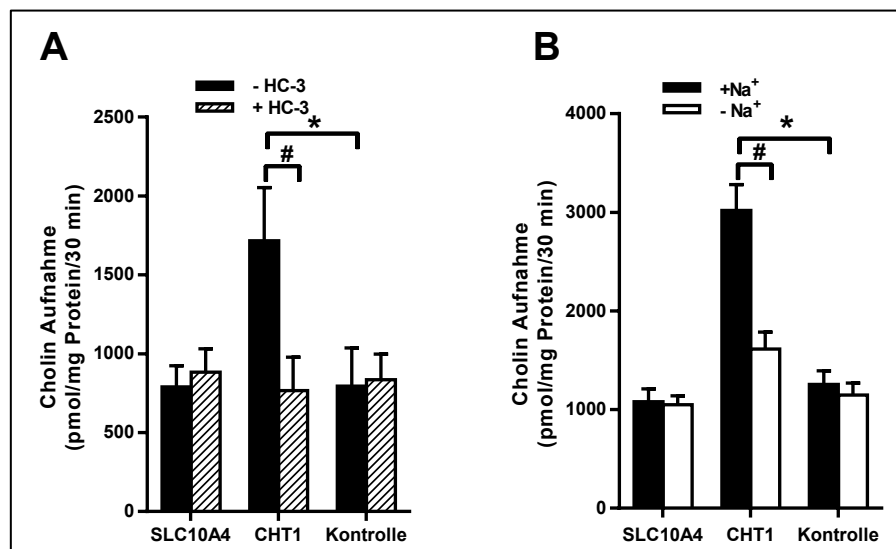


Abb. 4.7: Aufnahme von Cholin in GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert mit SLC10A4, CHT1 oder Leervektor

(A) GripTite 293 MSR-Zellen wurden transient mit SLC10A4, CHT1 oder Leervektor transfiziert und in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit (schraffierte Balken) von 1 μM Hemicholinium-3 (HC-3) als spezifischer Inhibitor von CHT1, für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Im Anschluß wurde mit 5 μM [^3H]Cholin über einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant niedrigerer Transport in Anwesenheit des Inhibitors, $p < 0,0001$. (B) GripTite 293 MSR-Zellen wurden transient transfiziert mit SLC10A4, CHT1 oder Leervektor und die Aufnahme von 5 μM [^3H]Cholin bei 37°C mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) für einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Für die Aufnahmemessung ohne Natrium wurde ein Lithiumtransportpuffer verwendet. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=4. * Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Aufnahme ohne Natrium, $p < 0,0001$. (Two-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparison Test).

Der Serotonintransporter (SERT) wurde als Positivkontrolle für die Aufnahme von Serotonin über die Plasmamembran verwendet. Nach einer transienten Transfektion von SERT und SLC10A4 in GripTite 293 MSR-Zellen war eine natriumabhängige und Citalopram-sensitive Aufnahme von Serotonin über den SERT darstellbar (Abb. 4.8). Allerdings konnte für SLC10A4 keine Aufnahme von Serotonin in HEK293-Zellen nachgewiesen werden.

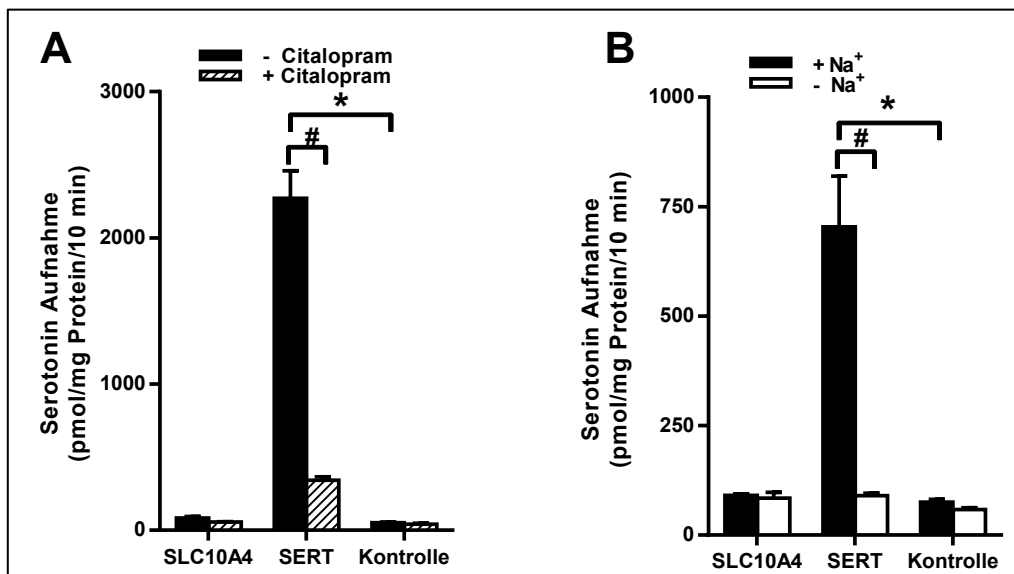


Abb. 4.8: Aufnahme von Serotonin in GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert mit SLC10A4, SERT oder Leervektor

(A) GripTite 293 MSR-Zellen wurden transient mit SLC10A4, SERT oder Leervektor transfiziert und in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit (schraffierte Balken) von 2 μM Citalopram als spezifischer Inhibitor von SERT, für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Im Anschluß wurde mit 5 μM [^3H]Serotonin über einen Zeitraum von 10 min inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant niedrigerer Transport in Anwesenheit des Inhibitors, $p < 0,0001$. (B) GripTite 293 MSR-Zellen wurden transient transfiziert mit SLC10A4, SERT oder Leervektor und die Aufnahme von 5 μM [^3H]Serotonin bei 37°C mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) für einen Zeitraum von 10 min gemessen. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=4. * Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Aufnahme ohne Natrium, $p < 0,0001$ (Two-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparison Test).

Der Dopamintransporter (DAT) ist ebenfalls in der Plasmamembran der Präsynapse lokalisiert und transportiert Dopamin und auch Noradrenalin (Dopamin>Noradrenalin) aus dem synaptischen Spalt über die Plasmamembran zurück in das Zellinnere. Die Aufnahme von Dopamin ist für den humanen DAT in HEK293-Zellen bereits beschrieben (Sitte et al. 2002) und war auch in unseren Experimenten in transient (Abb. 4.9) und auch stabil transfizierten DAT-HEK293-Zellen (Abb. 4.10) messbar. Die Aufnahme über DAT ist Na^+ -abhängig und sensitiv für den hier verwendeten Inhibitor Nomifensin (10 μM). Dopamin zeigte in manchen Versuchen eine Tendenz zu einer vermehrten Akkumulation in den SLC10A4-HEK293-Zellen. Diese war jedoch nicht zuverlässig replizierbar und deshalb in der statistischen Auswertung aller Versuche mit Dopamin nicht signifikant.

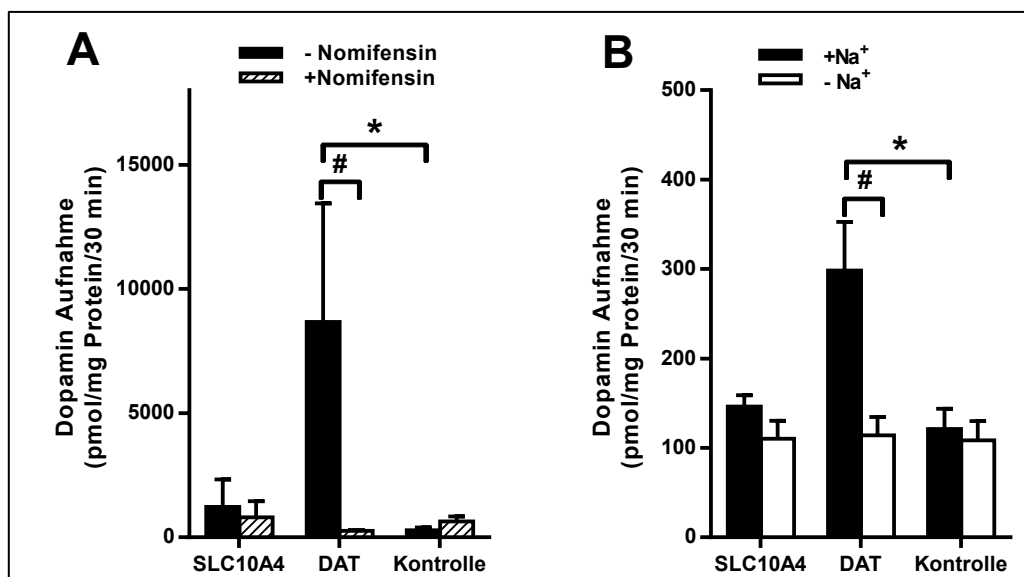


Abb. 4.9: Aufnahme von Dopamin in GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert mit SLC10A4, DAT oder Leervektor

(A) GripTite 293 MSR-Zellen wurden transient mit SLC10A4, DAT oder Leervektor transfiziert und in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit (schraffierte Balken) von 10 μM Nomifensin als spezifischer Inhibitor von DAT, für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Im Anschluß wurde mit 5 μM [^3H]Dopamin über einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ eines repräsentativen Experimentes mit je $n=4$. * Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant niedrigerer Transport in Anwesenheit des Inhibitors, $p < 0,005$. (B) GripTite 293 MSR-Zellen wurden transient mit SLC10A4, DAT oder Leervektor transfiziert und die Aufnahme von 5 μM [^3H]Dopamin bei 37°C mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) für einen Zeitraum von 30 min gemessen. Alle Werte sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ zweier unabhängiger Versuche mit je $n=4$. * Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Aufnahme ohne Natrium, $p < 0,0001$ (Two-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparison Test).

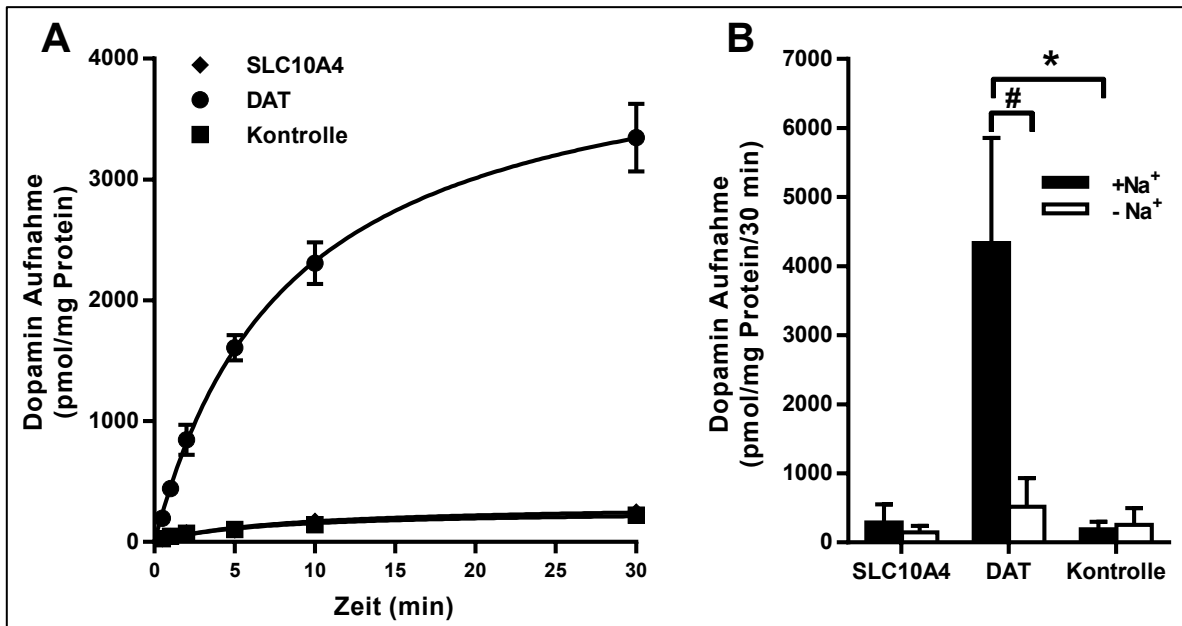


Abb. 4.10: Aufnahme von Dopamin in stabil transfizierte SLC10A4- und DAT-HEK293-Zellen

Aufnahme von 5 μM [^3H]Dopamin in stabil transfizierte SLC10A4-HEK293 und DAT-HEK293-Zellen. Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. **(A)** Die Inkubation erfolgte bei 37°C in Transportpuffer mit Natrium. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW \pm SD eines Experimentes mit je n=4. **(B)** Die Inkubation erfolgte bei 37°C mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) für einen Zeitraum von 30 min. Alle Werte sind MW \pm SD aus 6 unabhängigen Versuchen mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Aufnahme ohne Natrium, $p < 0,0001$ (Two-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparison Test).

Für die Aufnahmemessungen mit Noradrenalin konnte der DAT ebenfalls als Positivkontrolle verwendet werden. Er zeigte sich auch in diesen Messungen natriumabhängig und durch den Inhibitor Nomifensin hemmbar. Jedoch konnte keine vermehrte Aufnahme von Noradrenalin in die SLC10A4-HEK293-Zellen festgestellt werden.

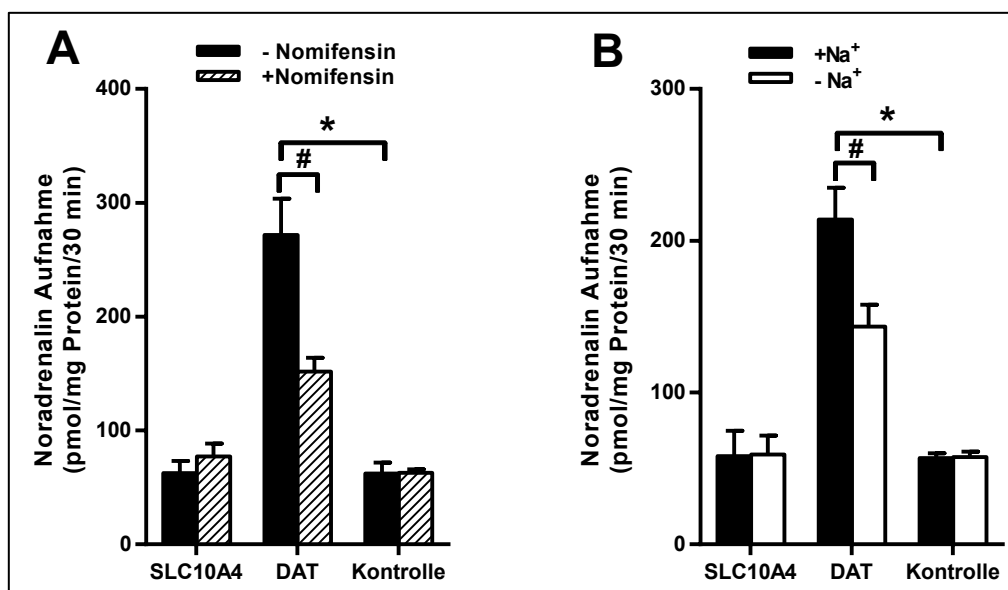


Abb. 4.11: Aufnahme von Noradrenalin in stabil transfizierte SLC10A4- und DAT-HEK293-Zellen

Aufnahme von Noradrenalin in stabil transfizierte SLC10A4- und DAT-HEK293-Zellen. Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. (A) Alle Zellen wurden in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit (schraffierte Balken) von 10 μM Nomifensin als spezifischer Inhibitor von DAT, für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Im Anschluß wurde mit 5 μM [^3H]Noradrenalin über einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und die zellassozierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant niedrigerer Transport in Anwesenheit des Inhibitors, $p < 0,0001$. (B) Die Aufnahme von 5 μM [^3H]Noradrenalin wurde bei 37°C mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) für einen Zeitraum von 30 min gemessen. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=4. * Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Aufnahme ohne Natrium, $p < 0,001$. (Two-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparison Test).

Weitere Aufnahmemessungen über die Plasmamembran wurden mit radioaktiv-markiertem Adenosintriphosphat (ATP) durchgeführt. Leider war für diese Versuche keine Positivkontrolle verfügbar. Da ATP sehr schnell abgebaut wird, wurden sehr kurze Meßzeiten gewählt (Abb. 4.12). Außerdem wurden zwei unterschiedlich radioaktiv-markierte Substanzen gemessen, zum einen das [^3H]-markierte ATP mit zwei Konzentrationen (5 mM, 5 μM) und zum anderen das nicht-hydrolysierbare ATP-Analog [^{35}S]Adenosin-5'-(γ -thio)-triphosphat (γ -S-ATP). Für Aufnahmemessungen mit den oben genannten Konditionen konnte keine veränderte Akkumulation von ATP in SLC10A4-HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden.

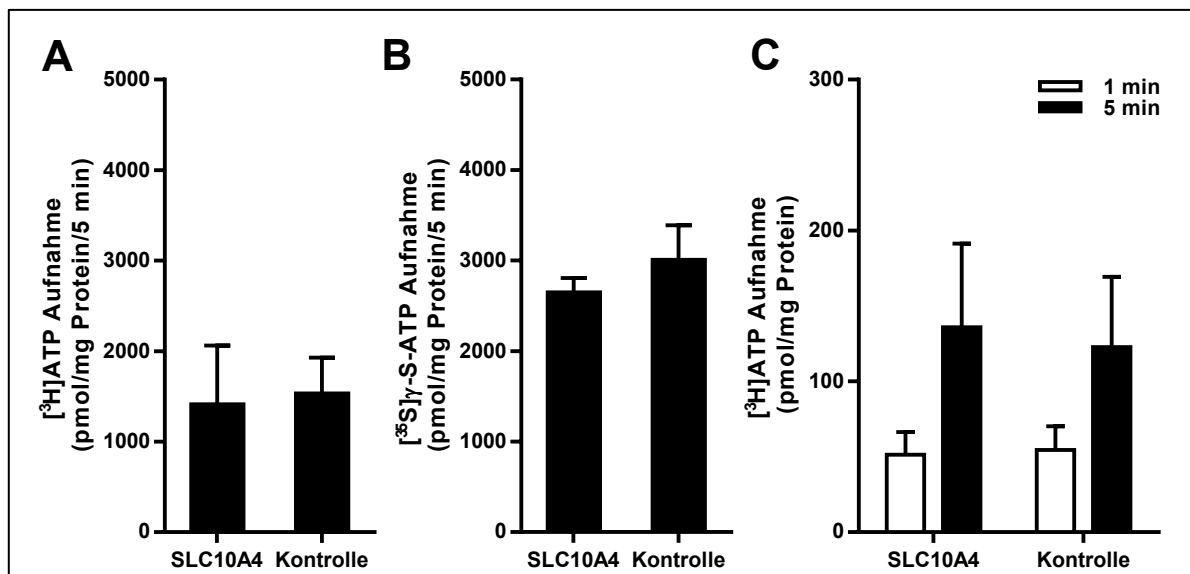


Abb. 4.12: Aufnahme von ATP in SLC10A4-HEK293-Zellen über kurze Zeitpunkte

Aufnahme von ATP in stabil transfizierte SLC10A4-HEK293-Zellen. Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in Transportpuffer mit Natrium. Es wurde die Aufnahme von 5 mM [^3H]ATP (A) und 5 mM [^{35}S]gamma-S-ATP (B) für einen Zeitraum von 5 min bestimmt, sowie die Aufnahme von 5 μM [^3H]ATP (C) für die angegebenen Zeitpunkte. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, lysiert und die zellassozierte Radioaktivität bestimmt. (A) Alle Werte sind MW \pm SD dreier unabhängiger Versuche mit je n=3. (B) Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=3. (C) Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=3 (ungepaarter t-Test).

Zusätzlich wurden Aufnahmeversuche in stabil transfizierte HEK293-Zellen mit ATP über lange Zeiträume (30, 60 min) durchgeführt. In diesen vier unabhängigen Versuchen zeigte sich eine signifikant erniedrigte Aufnahme in die SLC10A4-HEK293-Zellen im direkten Vergleich zur Kontrollzelllinie (Abb. 4.13).

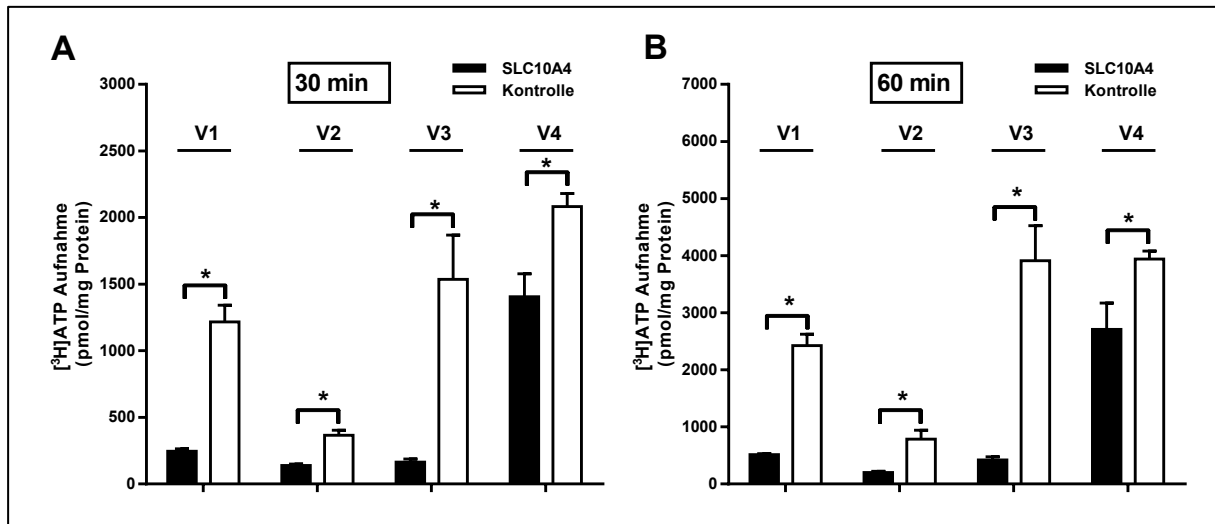


Abb. 4.13: Aufnahme von ATP in SLC10A4-HEK293-Zellen über lange Zeitpunkte

Aufnahme von ATP in stabil transfizierte SLC10A4-HEK293-Zellen. Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in Transportpuffer mit Natrium. Es wurde die Aufnahme von 5 µM [³H]ATP für einen Zeitraum von 30 min (A) und 60 min (B) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW ± SD von vier unabhängigen Versuchen (V1-V4) mit je n=3 (V1+V2) oder n=4 (V3+V4). * Signifikant niedrigere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, p<0,005 (ungepaarter t-Test).

4.5.2 Transportstudien an Flp-In T-REx HEK293-Zellen über die permeabilisierte Plasmamembran

Als nächstes wurde die mögliche Funktion von SLC10A4 im direkten Vergleich mit VMAT2 und VACHT analysiert. Dafür verwendeten wir Flp-In T-REx HEK293-Zellen, welche stabil transfiziert waren mit SLC10A4, VMAT2 oder VACHT. Für eine Aufnahmemessung in intrazelluläre Kompartimente wurden diese dem Substrat durch eine Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin zugänglich gemacht. In diesen Experimenten zeigte der VMAT2 eine signifikante ATP-abhängige Aufnahme von [³H]Serotonin, [³H]Noradrenalin und [³H]Dopamin, welche sensitiv sind für den selektiven Inhibitor Tetrabenazin (TBZ). Auch durch Zugabe des Protonenionophors Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), welches den pH-Gradienten zwischen Vesikel und Zytosol zerstört, konnte die Aufnahme verhindert werden. Die unspezifische Bindung der Substrate wurde bei einer Temperatur von 4°C bestimmt. Im Vergleich dazu zeigte SLC10A4 keine Aufnahme von Serotonin, Noradrenalin, Dopamin in dieser vesikulären Transportmessung (Abb. 4.14 A, B,

C). Obwohl die immunzytochemischen Experimente und auch die Real-Time PCR die stabile Expression von VACHT und SLC10A4 bestätigten, konnte in diesem *in vitro* Assay der stabil transfizierten, permeabilisierten Flp-In T-REx HEK293-Zellen kein Transport von Acetylcholin über den VACHT und SLC10A4 nachgewiesen werden (Abb. 4.14 D).

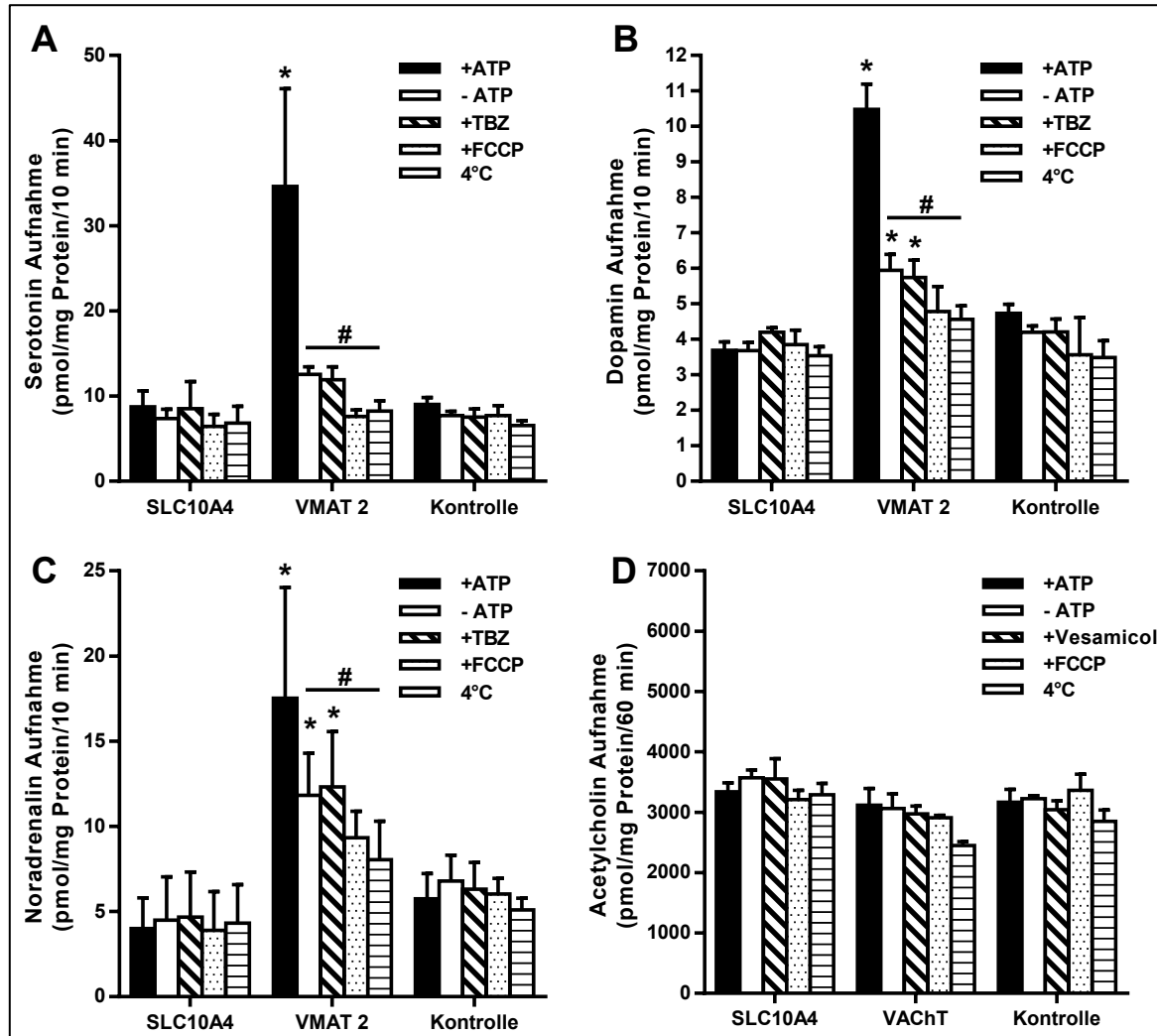


Abb. 4.14: Aufnahme von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Acetylcholin in Digitonin-permeabilisierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen

Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden stabil mit SLC10A4, VMAT2 oder VACHT transfiziert und mit 15 μ M Digitonin für 10 min permeabilisiert. Anschließend wurde die Aufnahme von 400 nM [3 H]Serotonin (A), 400 nM [3 H]Dopamin (B), 400 nM [3 H]Noradrenalin (C) und 400 μ M [3 H]Acetylcholin (D) für den angegebenen Zeitraum bei 37°C und 4°C gemessen. Flp-In T-REx HEK293-Zellen dienten als Kontrolle. Die Aufnahme wurde mit und ohne 5 mM Mg-ATP, mit 2 μ M Tetrabenazin (TBZ) oder 4 μ M Vesamicol (D) und 5 μ M FCCP durchgeführt. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=4 (Dopamin und Acetylcholin) oder zweier unabhängiger Versuche mit je n=8 (Serotonin und Noradrenalin). *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant niedrigerer Transport ohne ATP, in Anwesenheit der Inhibitoren TBZ, FCCP und bei 4°C, p < 0,0005 (Two-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparison Test).

Auch in diesem Expressionsmodell wurden Messungen mit ATP als Substrat durchgeführt. Da die Klonierung des vesikulären Nukleotidtransporters (VNUT), dessen Substrat ATP ist, nach mehrmaligen Versuchen nicht gelang, musste auf die Positivkontrolle verzichtet werden. Es wurden erneut kurze Zeitpunkte gewählt, da ATP einem sehr schnellen Abbauprozess unterliegt (Abb. 4.15). Es konnte in diesen Messungen keine Akkumulation von ATP in die vesikulären Kompartimente der permeabilisierten SLC10A4-HEK293-Zellen detektiert werden.

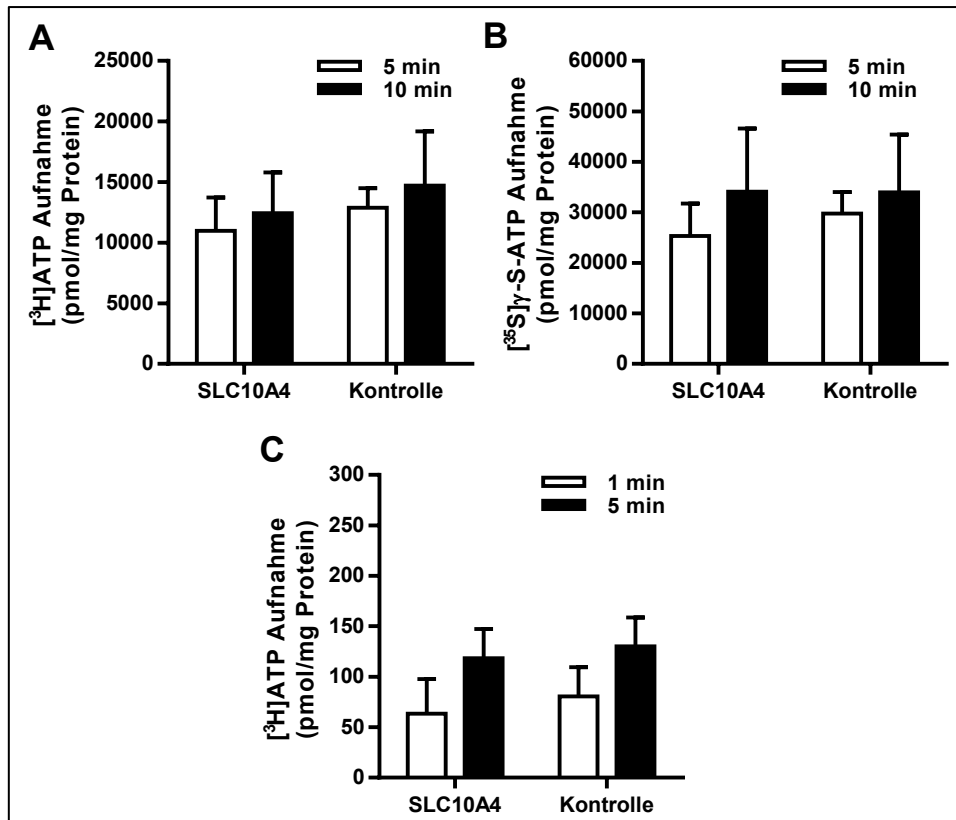


Abb. 4.15: Aufnahme von ATP in Digitonin-permeabilisierte SLC10A4-HEK293-Zellen

SLC10A4-HEK293-Zellen und Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden mit 15 μ M Digitonin für 10 min permeabilisiert. Anschließend wurde die Aufnahme von 5 mM [3 H]ATP (**A**), 5 mM [35 S] γ -S-ATP (**B**) und 5 μ M [3 H]ATP (**C**) für den angegebenen Zeitraum bei 37°C gemessen. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. (**A**) Alle Werte sind MW \pm SD von 4 unabhängigen Versuchen mit je n=3. (**B, C**) Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=3 (*ungepaarter t-Test*).

4.5.3 Transportstudien an Flp-In T-REx HEK293-Zellen nach einer Vorinkubation mit der Protease Thrombin

Erst kürzlich wurde berichtet, dass die Behandlung mit der Protease Thrombin eine Abspaltung der N-terminalen Domäne des SLC10A4-Proteins bewirken soll und dadurch ein Transport der GS TC und LC aktiviert werden kann (Abe et al. 2013). Diese Daten wurden in einer neuronalen Zellkultur aus TE671-Zellen generiert und sollten in dem Expressionssystem der stabil transfizierten HEK293-Zellen überprüft werden. Die stabilen

Zelllinien SLC10A4-HEK293, NTCP-HEK293 und die Flp-In T-REx HEK293-Zellen wurden vor der Aufnahmemessung für 3 h mit 1U/200 µl Thrombin (gelöst in Transportpuffer) inkubiert oder aber für einen direkten Vergleich nur in Transportpuffer ohne Zugabe von Thrombin inkubiert. Im direkten Anschluss erfolgten die Aufnahmemessungen mit [³H]DHEAS, [³H]TC, [³H]PREGS, und [³H]LC. Wie erwartet zeigte der NTCP eine signifikante Transportaktivität für DHEAS (Ratio NTCP/Kontrolle: 7,30), TC (Ratio NTCP/Kontrolle: 162,9) und PREGS (Ratio NTCP/Kontrolle: 7,52), welcher durch die Inkubation mit Thrombin nicht zu beeinflussen war (Abb. 4.16 A, C, D). Im Gegensatz dazu transportierte SLC10A4 diese Substanzen auch nach einer Vorinkubation mit Thrombin nicht. Für die Gallensäure LC konnte kein Transport über NTCP und SLC10A4 beobachtet werden und es zeigte sich auch kein Effekt zwischen den Gruppen, welche mit und ohne Thrombin inkubiert wurden (Abb. 4.16 B). Die Transportaktivität von SLC10A4 konnte in diesem Zellmodell nicht durch die Vorbehandlung mit Thrombin aktiviert werden.

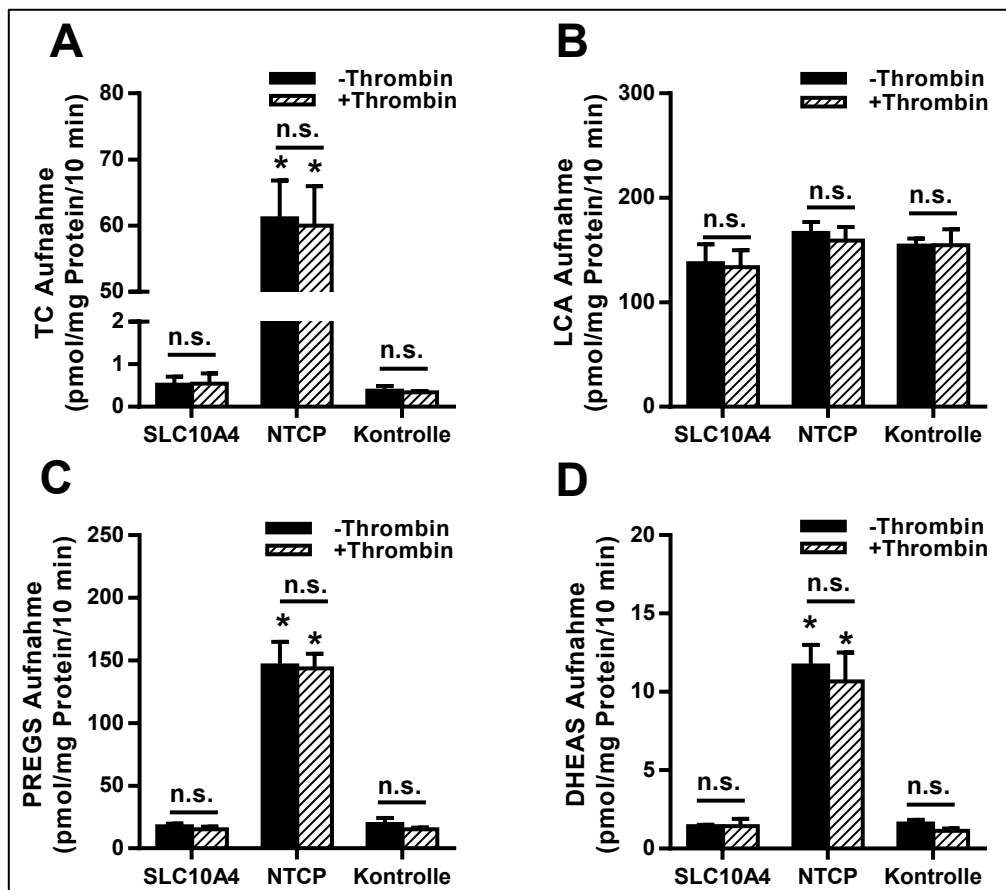


Abb. 4.16: Aufnahme von DHEAS, TC, PREGS und LC in stabil transfizierte Flp-In T-REx HEK293-Zellen nach Vorinkubation mit der Protease Thrombin

SLC10A4-HEK293 und NTCP-HEK293-Zellen wurden mit 1Unit/200 µl Thrombin (schraffierte Balken) oder ohne Thrombin (schwarze Balken) für 3 h vorinkubiert. Anschließend wurde die Aufnahme von 300 nM [³H]TC (A), 300 nM [³H]LC (B), 300 nM [³H]PREGS (C) und 300 nM [³H]DHEAS (D) für 10 min bei 37°C gemessen. Flp-In T-REx HEK293-Zellen dienen als Kontrolle. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW ± SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=3 (A, C, D) oder MW ± SD eines repräsentativen Experimentes (B) mit n=6. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, p<0,0001 (Two-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test).

4.5.4 Transportstudien an *X. laevis* Oozyten

Für den humanen SLC10A4 und für den rSlc10a4 der Ratte wurden Aufnahmestudien an *X. laevis* Oozyten mit einem großen Spektrum verschiedener Neurotransmitter und weiteren Kandidatensubstraten durchgeführt. Für diese Experimente dienten Wasser-injizierte Oozyten als Negativkontrolle. Passend zum jeweiligen Substratspektrum wurden Oozyten mit der cRNA kodierend für den SERT, DAT, NTCP oder mOCT1 injiziert und als Positivkontrolle verwendet. Die Ausgangsplasmide für die cRNA Synthese von NTCP und mOCT1 waren bereits am Institut im Rahmen eines anderen Projektes generiert worden (Dr. B. Döring, D. Kleinlützum). Nach drei Tagen Proteinexpression wurden die Oozyten mit dem jeweiligen Substrat in angegebener Konzentration und Zeitdauer bei Raumtemperatur inkubiert.

4.5.4.1 Transportstudien an *X.laevis* Oozyten mit Substraten des NTCPs

Als Substrate wurden die GS TC und LC, aber auch die Steroidsulfate DHEAS, PREGS und E₁S verwendet. Der natriumabhängige Transport von TC über den NTCP konnte in diesem Expressionsmodell sehr schön dargestellt werden (Abb. 4.17). Die Oozyten, welche mit SLC10A4 oder rSlc10a4 cRNA injiziert wurden, zeigten keine Akkumulation von TC, weder mit noch ohne Natrium.

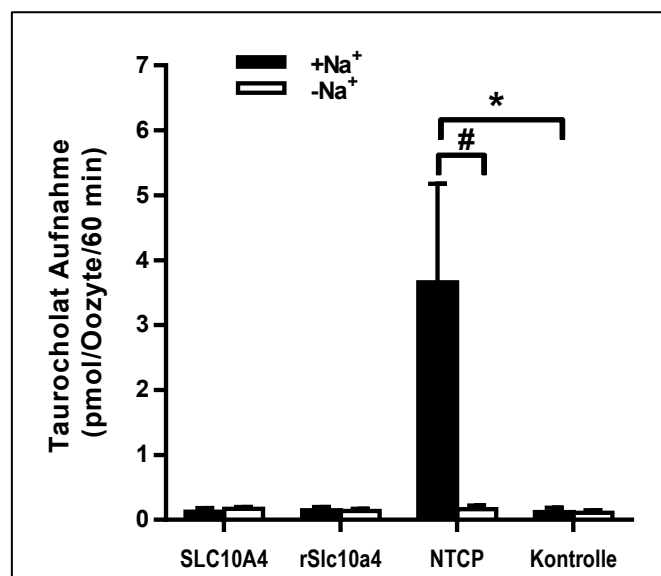


Abb. 4.17: Aufnahme von TC in *X. laevis* Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP

X. laevis Oozyten wurden mit der cRNA von SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP injiziert und die Aufnahme von 1 μ M [³H]TC bei Raumtemperatur mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) für einen Zeitraum von 60 min gemessen. Als Kontrolle wurden H₂O-injizierte Oozyten verwendet. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes je n=8-15 Oozyten. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. # Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Aufnahme ohne Natrium, $p < 0,0001$ (Two-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test).

Für die Gallensäure LC konnte weder eine Aufnahme über den NTCP, noch über den SLC10A4 und den rSlc10a4 nachgewiesen werden. Die Steroidsulfate DHEAS, PREGS und E₁S hingegen zeigten einen stabilen Transport über den NTCP im Expressionsmodell der *X. laevis* Oozyten. Jedoch konnte für diese Substrate kein Transport durch SLC10A4 und auch nicht durch rSlc10a4 dargestellt werden.

Tab. 4.3: Aufnahme von [³H]-markiertem LC, DHEAS, PREGS und E₁S in *X. laevis* Oozyten injiziert mit cRNA von SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP

	SLC10A4		rSlc10a4		NTCP	
Substanz	Aufnahme (pmol/Oozyte /10 min)	Ratio	Aufnahme (pmol/Oozyte /10 min)	Ratio	Aufnahme (pmol/Oozyte /10 min)	Ratio
LC (1 µM)	3,61 ± 0,20	1,41	3,05 ± 0,14	1,19	3,02 ± 0,10	1,18
	Aufnahme (pmol/Oozyte /30 min)	Ratio	Aufnahme (pmol/Oozyte /30 min)	Ratio	Aufnahme (pmol/Oozyte /30 min)	Ratio
DHEAS (1 µM)	0,039 ± 0,0021	0,81	0,040 ± 0,002	0,84	0,299 ± 0,067	6,21*
PREGS (10 µM)	1,29 ± 0,067	1,12	1,25 ± 0,083	1,08	16,23 ± 0,829	14,03*
E ₁ S (10 µM)	0,049 ± 0,0014	0,81	0,049 ± 0,0021	0,81	0,419 ± 0,038	6,98*

Alle Werte sind MW ± SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=8-15 Oozyten. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, p<0,001 (*ungepaarter t-Test*). Die Ratio steht für die Aufnahme in Oozyten, welche mit potentiellen Transportern injiziert waren, dividiert durch die Aufnahme in die H₂O-injizierten Kontrollloozyten.

4.5.4.2 Transportstudien an *X. laevis* Oozyten nach einer Vorinkubation mit Thrombin

Wie bereits im Zellkulturmodell beschrieben (4.6.3), so wurde auch im Expressionsmodell der *X. laevis* Oozyten versucht, die mögliche Transportfunktion von SLC10A4 für GS durch Vorinkubation der injizierten Oozyten mit der Protease Thrombin zu aktivieren. Dafür wurden *X. laevis* Oozyten mit der cRNA von SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP injiziert und im Anschluss an die dreitägige Proteinexpression mit 1 Unit Thrombin für 200 µl Transportpuffer für 3 h inkubiert. Danach folgte die Aufnahmemessung mit den GS LC und TC. TC ist ein Substrat des NTCP und wird signifikant mit einer Ratio von 95,14 (NTCP Aufnahme:Kontrollaufnahme) in das Innere der Oozyten transportiert (Abb. 4.18 A). Dieser Transport lässt sich durch die Behandlung mit Thrombin nicht steigern. Weder die Aufnahme von TC, noch die Aufnahme von LC (Abb. 4.18 B) in die mit den *orphan carriern* injizierten *X. laevis* Oozyten werden durch die Vorinkubation mit Thrombin signifikant verändert und überschreiten auch nicht die Aufnahme in die H₂O-injizierten Kontrollloozyten. In diesem

Expressionsmodell konnte also die Transportaktivität von SLC10A4 und rSlc10a4 für die GS TC und LC nicht durch die Vorbehandlung mit Thrombin aktiviert werden.

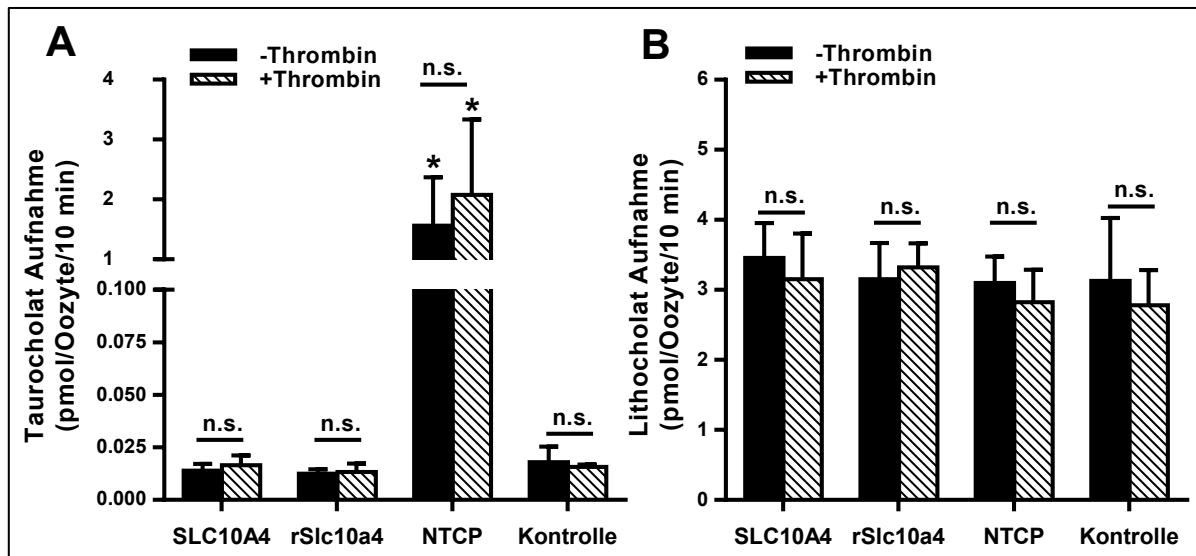


Abb. 4.18: Aufnahme von TC und LC in *X. laevis* Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP nach Vorinkubation mit der Protease Thrombin

X. laevis Oozyten wurden mit der cRNA von SLC10A4, rSlc10a4 und NTCP injiziert und die Aufnahme von 1 μ M [3 H]TC (A) oder 1 μ M [3 H]LC (B) bei Raumtemperatur ohne (schwarze Balken) und mit Vorinkubation (3 h) mit 1 Unit Thrombin/200 μ l (schraffierte Balken) für einen Zeitraum von 10 min gemessen. Als Kontrolle wurden H₂O-injizierte Oozyten verwendet. (A) Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit $n \geq 7$ Oozyten. (B) Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je $n \geq 7$ Oozyten. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, $p < 0,0001$ (Two-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test).

4.5.4.3 Transportstudien an *X. laevis* Oozyten mit Neurotransmittern

Eine weitere Möglichkeit ein Substrat für den *orphan carrier* SLC10A4/rSlc10a4 zu finden und den Transport funktionell zu charakterisieren, war ein großes Screening mit verschiedenen Neurotransmittern. Wenn vorhanden, wurden bereits charakterisierte Neurotransmittertransporter als Positivkontrolle für eine Substrataufnahme verwendet. Falls keine Positivkontrolle vorhanden war, wurde die Ratio zwischen der Aufnahme in SLC10A4/rSlc10a4 injizierte Oozyten und der Aufnahme in H₂O-injizierte Oozyten berechnet und bewertet. Für die Aufnahmemessung von Dopamin konnte der Dopamintransporter (DAT) als Positivkontrolle verwendet werden und zeigte eine signifikante Aufnahme von Dopamin (Ratio DAT/H₂O: 2,82) über die Zellmembran in das Innere der Oozyte (Abb. 4.19 A). Der *Organic Cation Transporter* der Maus (mOct1) transportiert das Substrat Histamin (Abb. 4.19 B) mit einer signifikanten Transportrate (Ratio mOct1/H₂O: 3,13). Allerdings konnte für die beiden aufgeführten Substrate in den *X. laevis* Oozyten kein Transport für SLC10A4 und auch nicht für rSlc10a4 bestätigt werden.

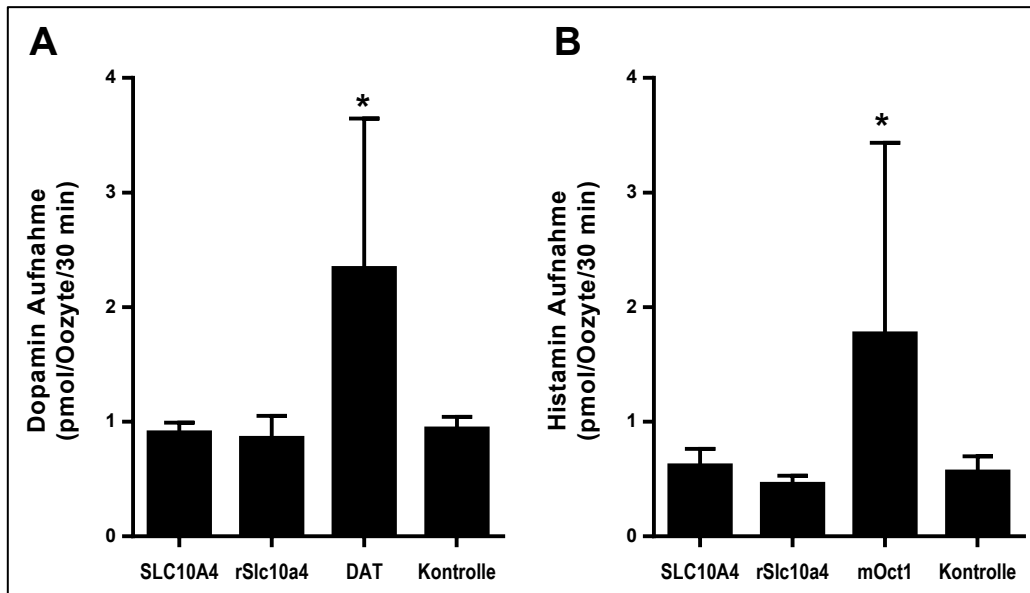


Abb. 4.19: Aufnahme von Dopamin und Histamin in *X. laevis* Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4, DAT oder mOct1

X. laevis Oozyten wurden mit der cRNA von SLC10A4, rSlc10a4, NTCP oder mOct1 injiziert und die Aufnahme von 10 μ M [3 H]Dopamin (**A**) und 10 μ M [3 H]Histamin bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 30 min gemessen. Als Kontrolle wurden H₂O-injizierte Oozyten verwendet. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit je $n \geq 12$ Oozyten. (**A**) *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, $p < 0,001$. (**B**) *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, $p < 0,01$ (One-way ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test).

Abgesehen von Dopamin und Histamin wurden weitere Kandidatensubstrate in den *X. laevis* Oozyten gemessen. Jedoch zeigten die SLC10A4-cRNA oder rSlc10a4-cRNA-injizierten Oozyten keine signifikante Aufnahme von Acetat, Aspartat, Cholin, γ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamat, Noradrenalin, Acetylcholin und Adenosintriphosphat (ATP) im Vergleich zu den H₂O-injizierten Kontrollloozyten (Tab. 4.3).

Tab. 4.4: Aufnahme von [³H]- und [³⁵S]-markierten Neurotransmittern in *X. laevis* Oozyten injiziert mit cRNA von SLC10A4 und rSlc10a4

SLC10A4			rSlc10a4	
Substanz	Aufnahme (pmol/Oozyte/60 min)	Ratio	Aufnahme (pmol/Oozyte/60 min)	Ratio
Acetat (25 µM)	8,79 ± 0,51	1,05	8,79 ± 0,46	1,05
Aspartat (1 µM)	0,22 ± 0,008	0,79	0,21 ± 0,014	0,74
Cholin (1 µM)	2,68 ± 0,52	1,22	1,80 ± 0,14	0,82
GABA (1 µM)	0,52 ± 0,046	1,11	0,47 ± 0,038	1,00
Glutamat (1 µM)	0,014 ± 0,0015	1,04	0,015 ± 0,0015	1,12
Noradrenalin (1 µM)	0,16 ± 0,010	0,77	0,19 ± 0,010	0,87
	Aufnahme (pmol/Oozyte/30 min)	Ratio	Aufnahme (pmol/Oozyte/30 min)	Ratio
Acetylcholin (10 µM)	43,51 ± 3,62	1,16	33,46 ± 4,69	0,89
	Aufnahme (pmol/Oozyte/10 min)	Ratio	Aufnahme (pmol/Oozyte/10 min)	Ratio
ATP (5 mM)	70,66 ± 9,06	1,03	67,91 ± 4,50	0,99
[³⁵ S] γ-S-ATP (5mM)	69,76 ± 4,363	1,02	67,82 ± 2,546	1,00

Alle Werte sind MW ± SD eines repräsentativen Experimentes mit je n=10-15 Oozyten. Die Ratio steht für die Aufnahme in Oozyten, welche mit potenziellen Transportern injiziert waren, geteilt durch die Aufnahme in die H₂O-injizierten Kontrolloozyten. Alle Substanzen waren [³H]-markiert, bis auf das gekennzeichnete [³⁵S]γ-ATP.

Für die Aufnahmemessung von Serotonin in *X. laevis* Oozyten wurde erneut der SERT als Positivkontrolle verwendet. Der SERT zeigte eine signifikante Aufnahme von 1 µM Serotonin, welche ohne Natrium reduziert war und sich durch die Zugabe der Inhibitoren Citalopram, einem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) und Desipramin, einem nichtselektiven Monoamin-Wiederaufnahmehemmer (NSMRI) signifikant hemmen ließ. In einem weiteren Experiment zeigte Serotonin eine Akkumulation in *X. laevis* Oozyten injiziert mit SLC10A4-cRNA (Ratio=2,06) und in Oozyten injiziert mit rSlc10a4-cRNA (Ratio=1,29) (Abb. 4.20).

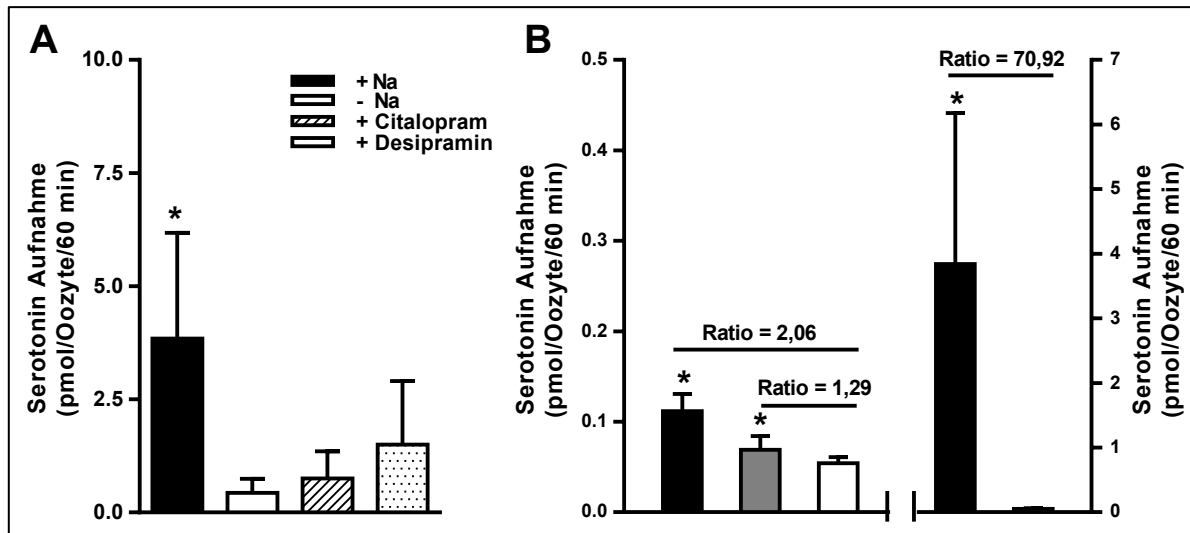


Abb. 4.20: Signifikant höhere Aufnahme von Serotonin in *X. laevis* Oozyten injiziert mit SLC10A4, rSlc10a4 und SERT

(A) *X. laevis* Oozyten wurden mit SERT-cRNA injiziert und die Aufnahme von 1 μ M [3 H]Serotonin mit Natrium (schwarzer Balken), ohne Natrium (weißer Balken), mit 1 μ M Citalopram (schraffierter Balken) oder mit 10 μ M Desipramin (gepunkteter Balken) bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 60 min gemessen. Alle Werte sind MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit n= 10 Oozyten. *Signifikant höhere Aufnahme, p<0,01. (B) *X. laevis* Oozyten wurden mit der cRNA von SLC10A4, rSlc10a4 und SERT injiziert und die Aufnahme von 1 μ M [3 H]Serotonin bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 60 min gemessen. Als Kontrolle wurden H₂O-injizierte Oozyten verwendet. Die x-Achse wurde zur besseren Darstellbarkeit unterbrochen. Die Kontrollwerte sind auf beiden Seiten identisch. Alle Werte sind MW \pm SD eines Experimentes mit je n=12 Oozyten. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, p<0,001. (One-way ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test).

Um dieses Resultat zu bestätigen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dabei wurde der SERT als Postitivkontrolle beibehalten, da man über seine Ratio Auskunft über die Intaktheit der [3 H]-markierten Substanz Serotonin und auch über die Qualität der verwendeten Charge von *X. laevis* Oozyten erhielt. Die Messungen wurden mit einer Serotoninkonzentration von 0,1 μ M (Abb. 4.21 A) und 1 μ M (Abb. 4.21 B) über 60 min und nochmals mit 1 μ M über einen Zeitraum von 90 min (Abb. 4.21 C) durchgeführt. In diesen Experimenten akkumulierte Serotonin nicht in den mit SLC10A4/rSlc10a4-injizierten Oozyten. Der SERT zeigte jedoch in jedem Experiment eine signifikante Aufnahme von Serotonin.

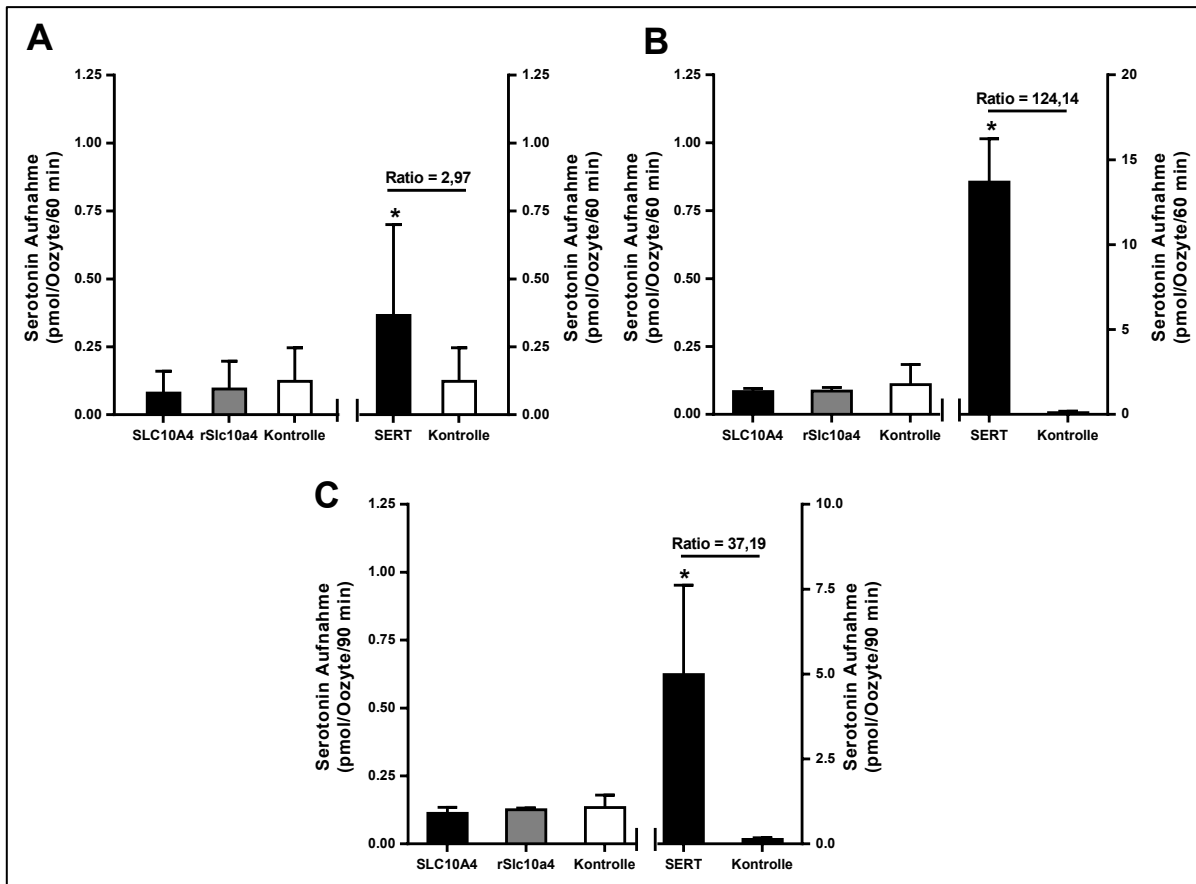


Abb. 4.21: Nicht signifikante Aufnahme von Serotonin in *X. laevis* Oozyten injiziert mit SLC10A4 und rSlc10a4

X. laevis Oozyten wurden mit der cRNA von SLC10A4, rSlc10a4 und SERT injiziert und die Aufnahme von 0,1 μ M (A), 1 μ M (B, C) [3 H]Serotonin bei Raumtemperatur für den angegebenen Zeitraum von 60 min oder 90 min gemessen. Als Kontrolle wurden H_2O -injizierte Oozyten verwendet. Alle Werte sind MW \pm SD eines Experimentes mit je n=10-15 Oozyten. Die x-Achse wurde zur besseren Darstellbarkeit unterbrochen. Die Kontrollwerte sind auf beiden Seiten identisch. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, (A) $p < 0,0126$ und (B, C) $p < 0,0001$ (One-way ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test).

Die unterschiedlichen Resultate der Aufnahmemessungen für die Substanz Serotonin (signifikante Aufnahme vs. keine signifikante Aufnahme in SLC10A4/rSlc10a4 injizierte Oozyten) führten zu einer Vergrößerung des Versuchsaufbaues mit unterschiedlichen Parametern und zahlreichen Wiederholungen. Um die Datenauswertung von allen durchgeführten Experimenten mit Serotonin überschaubarer zu machen, wurde die graphische Darstellung in einem *Scatter Plot* (Abb. 4.22) gewählt. Gezeigt werden alle durchgeführten Experimente (Experimente n=28), welche je nach Versuchsaufbau in den folgenden Parametern variierten. Untersucht wurde die Dauer der Inkubation (15, 30, 60, 90, 180 min), die Konzentration von Serotonin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) und auch die Dauer der Proteinexpression (24 h, 72 h). Die Versuche wurden mittels t-Test statistisch analysiert und unterteilt in Experimente, bei welchen es einen signifikanten Unterschied der Serotoninaufnahme in SLC10A4/rSlc10a4-cRNA injizierte Oozyten im Vergleich zu den H_2O -injizierten Oozyten gab und in Experimente, die eine nicht signifikante Serotoninaufnahme

zeigten. Anschließend wurde die Ratio aus den Aufnahmewerten von Serotonin in SLC10A4/rSlc10a4 cRNA injizierte Oozyten dividiert durch die Aufnahmewerte in H₂O-injizierte Oozyten auf der y-Achse für die unterschiedlichen Gruppen dargestellt.

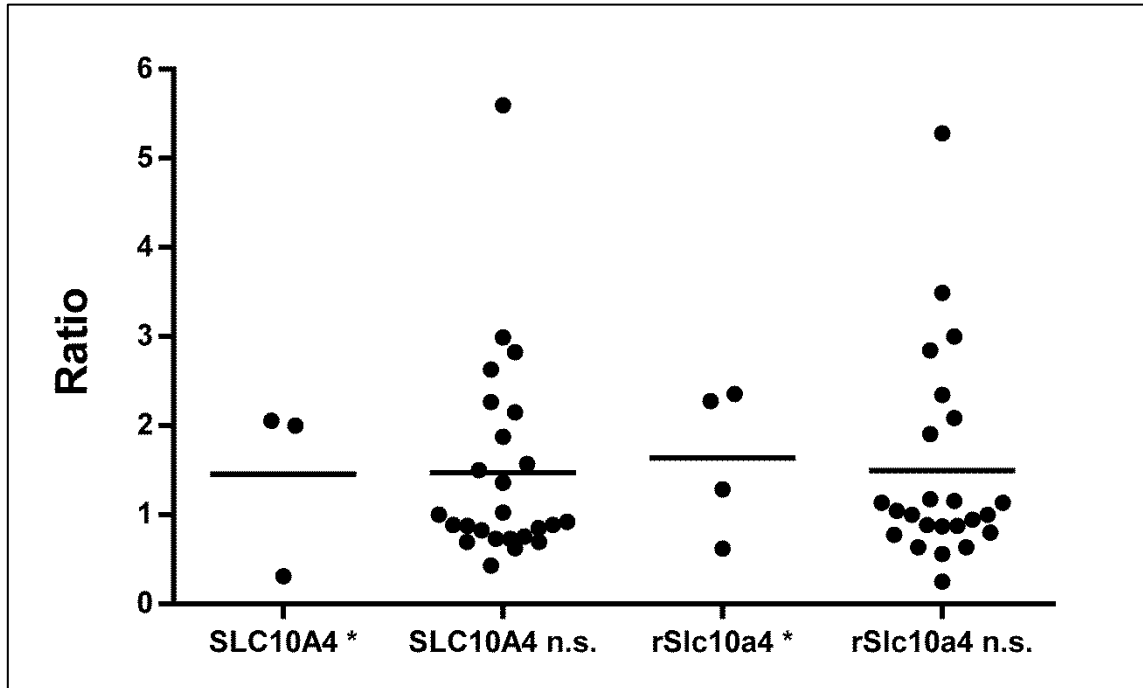


Abb. 4.22: Scatter Plot der Aufnahme von Serotonin in *X. laevis* Oozyten injiziert mit SLC10A4 und rSlc10a4

X. laevis Oozyten wurden mit der cRNA von SLC10A4 und rSlc10a4 injiziert und die Aufnahme von [³H]Serotonin (0,1 µM, 1 µM, 10 µM) bei Raumtemperatur für unterschiedliche Zeiträume (15, 30, 60, 90, 180 min) gemessen. Die Experimente wurden für SLC10A4 und rSlc10a4 jeweils in eine statistisch signifikante Gruppe (*) und eine statistisch nicht signifikante Gruppe (n.s.) aufgeteilt. Dargestellt ist die berechnete Ratio der Aufnahmeexperimente. Sie steht für die Aufnahme in Oozyten, welche mit potenziellen Transportern injiziert waren, geteilt durch die Aufnahme in die H₂O-injizierten Kontrollloozyten. Alle Werte sind MW ± SD eines Experimentes mit n ≥ 9-14 Oozyten. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, p<0,032 (ungepaarter t-Test).

Für SLC10A4 lässt sich zusammenfassend die Aussage treffen, dass bei Experimenten mit signifikanten Unterschieden die Ratio von 2,06 nicht überschritten wurde, sich aber in insgesamt 28 Experimenten nur ein weiteres Mal im Bereich von 2,00 messen ließ. Des Weiteren war auch ein Experiment signifikant, bei welchem weniger Serotonin in die mit SLC10A4-cRNA injizierten Oozyten aufgenommen wurde im Vergleich zu den Kontrollloozyten, was sich in einer Ratio von 0,31 auswirkte. Bei den Experimenten für SLC10A4, die keinen signifikanten Unterschied in der Aufnahme zeigten, sammelt sich ein Großteil der Daten im Bereich einer Ratio von ca. 1. Ratios, welche hier stark nach oben abwichen, waren bereits in den Rohdaten durch sehr inhomogene Werte und große Standardabweichungen gekennzeichnet. Für rSlc10a4 lässt sich die Aussage treffen, dass bei signifikanten Experimenten die Ratio von 2,36 nicht überschritten wurde, sich aber in insgesamt 28 Experimenten nur zweimal im Bereich von 2,28 und 1,29 messen ließ. Wie bei

SLC10A4 war ebenfalls ein Experiment signifikant, bei welchem weniger Serotonin in die mit rSlc10a4-cRNA injizierten Oozyten aufgenommen wurde im Vergleich zu den Kontrolloozyten, was sich in einer Ratio von 0,62 zeigte. Bei den Experimenten für rSlc10a4, welche keinen signifikanten Unterschied in der Aufnahme zeigten, sammelt sich ein Großteil der Daten ebenfalls im Bereich einer Ratio von ca.1. Eine Charakterisierung des Serotonintransporters war im *X. laevis* Oozyten Expressionsmodell sehr gut möglich, leider konnte weder für SLC10A4 noch für rSlc10a4 eine replizierbare Aufnahme von Serotonin gemessen werden.

4.6 Charakterisierung der *Slc10a4*-Knockout-Mauslinie B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex}

Die gelungene Deletion des *mSlc10a4*-Gens in der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus, welche von TIGM generiert wurde, wurde durch Analyse der genomischen DNA, der RNA und der Proteinexpression verifiziert.

4.6.1 Genotypisierung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Für die Etablierung der Genotypisierung wurden männliche und weibliche Tiere der heterozygoten F1-Generation verpaart. Im Alter von drei Wochen wurde den Nachkommen eine Schwanzbiopsie entnommen. Die aus den Biopsien gewonnene DNA (Kap.3.14.4) wurde als Matrize für eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern eingesetzt, welche eine eindeutige Zuweisung zu den Genotypen Wildtyp (+/+), Knockout (-/-) und Heterozygot (+/-) ermöglichten. Grundlage der Genotypisierung war die Amplifikation des *mSlc10a4*-Allels, welches in der genetisch veränderten B6.129S5- *Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus vom Wildtyp unterscheidbar ist. Die transkribierte Region des *mSlc10a4*-Gens enthält 3 Exone. Im rekombinierten *mSlc10a4*-Gen wurde ein Teil von Exon 1, das gesamte Exon 2 und Teile des Exon 3 durch den Zielvektor ersetzt (Abb. 4.23).

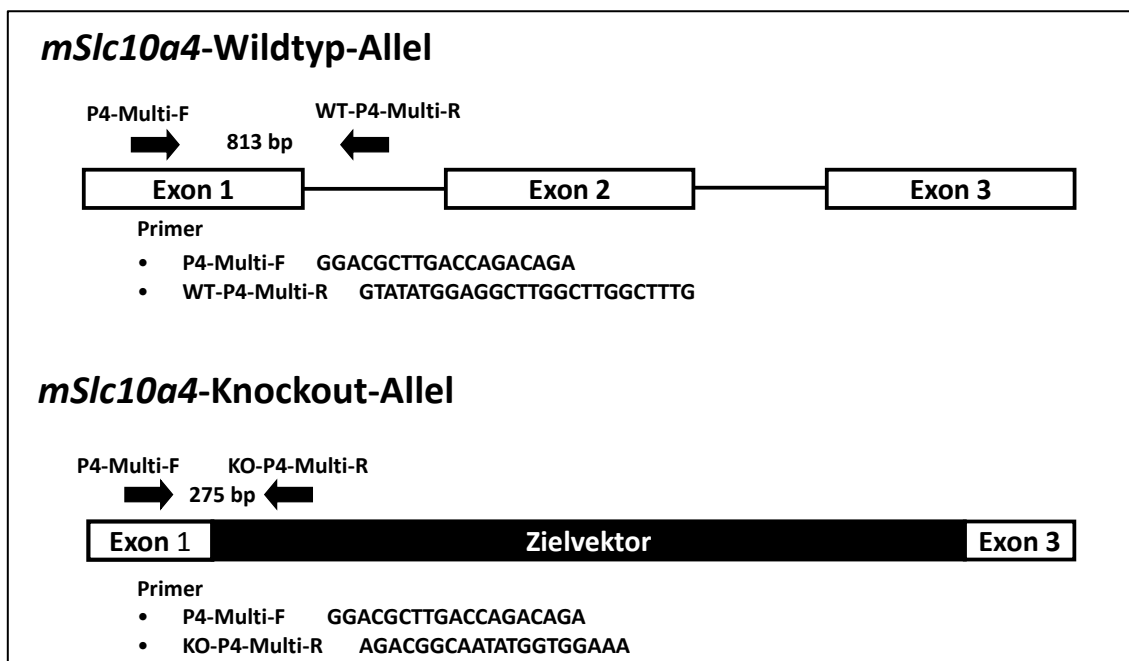


Abb. 4.23: Schema des Wildtyp- und *Slc10a4*-Knockout-Allels

Der Zielvektor ersetzt im *mSlc10a4*-Knockout-Allel Teile von Exon 1, das gesamte Exon 2 sowie einen Teil von Exon 3. Der 5'-Primer (P4-Multi-F) bindet an beide Allele, während die 3'-Primer (WT-P4-Multi-R, KO-P4-Multi-R) allelspezifisch sind. Bei der PCR entsteht für das Wildtyp-Gen ein Amplifikat mit einer Länge von 813 bp und für das rekombinierte Gen ein 275 bp langes Amplifikat.

Nach Optimierung der Primerkombinationen, Annealingtemperatur und Zyklenanzahl, wurde für jede Maus eine Multiplex-PCR durchgeführt bei der mehrere Primer in einem einzigen Ansatz verwendet wurden. Sie enthielt den P4-Multi-F 5'-Primer, der in 5'-Richtung vor dem Beginn des Zielvektors lokalisiert ist und dadurch mit dem Wildtyp-Allel und dem *mSlc10a4*-Knockout-Allel hybridisierte, den Wildtyp-spezifischen WT-P4-Multi-R 3'-Primer, der an eine im Wildtyp vorhandene Intron 1-Sequenz bindet und den Knockout-spezifischen KO-P4-Multi-R 3'-Primer, der an eine Sequenz im Zielvektor bindet. Für einen 20 µl Ansatz wurde 10 µl des *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo scientific) verwendet, welcher die *Phusion Flash II DNA Polymerase* bereits enthielt. Hinzu pipettiert wurden jeweils 1 µl Primer, 2 µl DNA und 5 µl ddH₂O. Die Proben wurden gründlich durchmischt, kurz abzentrifugiert und in einem *Perkin Elmer Cycler Typ 2400* nach dem folgenden Temperatur- und Zeitprotokoll inkubiert.

Denaturierung	98°C	10 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	98°C	5 s	
Annealing	60°C	10 s	
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	1 min	
Kühlung	4°C	∞	

Bei dem durchgeführten PCR-Protokoll gab es einige Abweichungen zu einem Standardprotokoll. Die hohe Thermostabilität der *hot start* Polymerase ermöglichte eine Denaturierung bei 98 °C für einen Zeitraum von nur 10 Sekunden. Als Elongationsdauer wurden 15 Sekunden pro 1000 Basenpaare (bp) vorgeschlagen. Insgesamt führte dies zu einem sehr schnell ablaufenden PCR-Protokoll. Damit ergab sich in der PCR für das Wildtyp-Allel ein Amplifikat von 813 bp Länge und für das *mSlc10a4*-Knockout-Allel ein Amplifikat von 275 bp Länge. Für heterozygote Mäuse wurden beide Amplifikate generiert. Die Größenbestimmung der PCR-Amplifikate erfolgte durch elektrische Auftrennung in Agarosegelen (Abb. 4.24).

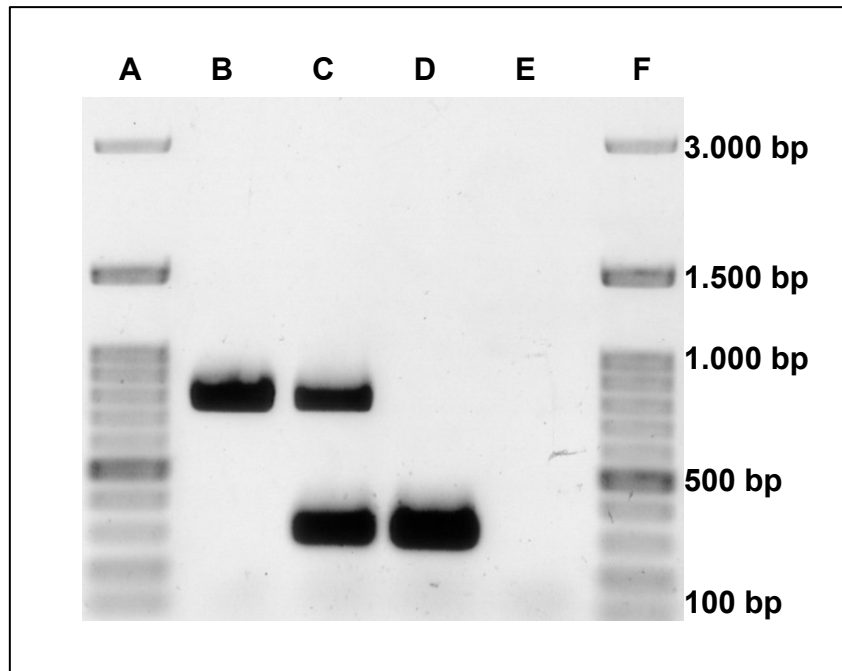


Abb. 4.24: Genotypisierung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Gezeigt ist eine representative Gelelektrophorese zur Bestimmung des Genotyps. Es lassen sich das 813 bp große Fragment für das Wildtyp-Allel (**B**) und das 275 bp große Fragment des *mSlc10a4*-Knockout-Allels (**D**) unterscheiden. Heterozygote Mäuse (**C**) weisen beide PCR-Produkte auf. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O anstatt DNA in die PCR eingesetzt (**E**). Verwendet wurde ein 1% Agarosegel und ein 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Genedirect) (**A**, **F**).

Nach der Auswertung der Agarosegele wurde der Genotyp jeder Maus in das *TierBase* Programm übertragen. Die sichere und replizierbare Genotypisierung war die Basis für alle weiteren Versuche mit der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus.

4.6.2 Analyse des Gendefektes auf Transkriptionsebene

Für den Nachweis des Gendefektes auf Transkriptionsebene wurde Gesamt-RNA aus dem Gehirn einer homozygoten B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus und dem korrespondierenden Wildtyp isoliert und die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Kap. 3.7). Die Primer für den Nachweis eines intakten *mSlc10a4*-Gens wurden so ausgewählt, dass der 5'-Primer, P4-Multi-F im Exon 1 lokalisiert war, und der 3'-Primer, r/m P4-R im Exon 3. Die Exon übergreifende Lage wurde gewählt, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern. Der 3'-Primer befand sich in dem Bereich, welcher bei der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus durch den Zielvektor ersetzt wurde und konnte mit dieser Sequenz nicht hybridisieren (Abb. 4.25).

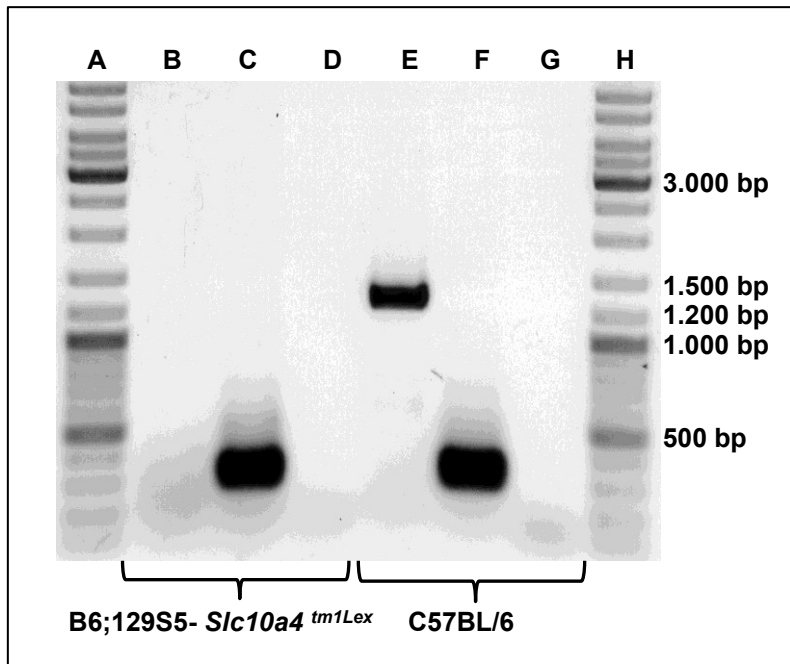


Abb. 4.26: Nachweis der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus auf mRNA-Ebene

Auf ein 1%-iges Agarosegel wurde der *GeneRulerDNA Ladder Mix* (A, H) aufgetragen. (B,C) PCR-Produkte mit cDNA einer homozygoten B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus. (E,F) PCR-Produkte mit cDNA einer C57BL/6 Wildtypmaus. (D,G) H₂O Kontrolle. (B,D,E) *Slc10a4*-spezifische Primer. (C,F,G) GAPDH Primer.

Das Ergebnis auf dem Agarosegel zeigt eine sehr starke Bande für die interne GAPDH Kontrolle der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus und der C57BL/6 Wildtypmaus. Bei beiden Mauslinien war folglich die RNA-Isolierung und die cDNA-Synthese erfolgreich. Die spezifische Bande für *Slc10a4* liegt bei der C57BL/6 Wildtyp Maus im Bereich der richtigen Größe. Bei der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus ist keine Bande in diesem Größenbereich auf dem Agarosegel nachzuweisen. Folglich konnte die Deletion auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden.

4.6.3 Analyse des Gendefektes auf Proteinebene

Um die gelungene Ausschaltung der Proteinexpression von mSlc10a4 in der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus zu überprüfen, wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt (Abb. 41). Die Expression und Lokalisation von rSlc10a4 in der Harnblase der Ratte wurde in einer weiteren Arbeit an unserem Institut bereits ausführlich beschrieben (Dr. S. Burger). Vergleichend dazu wurde die Harnblase auch für diese Experimente als Modellorgan gewählt.

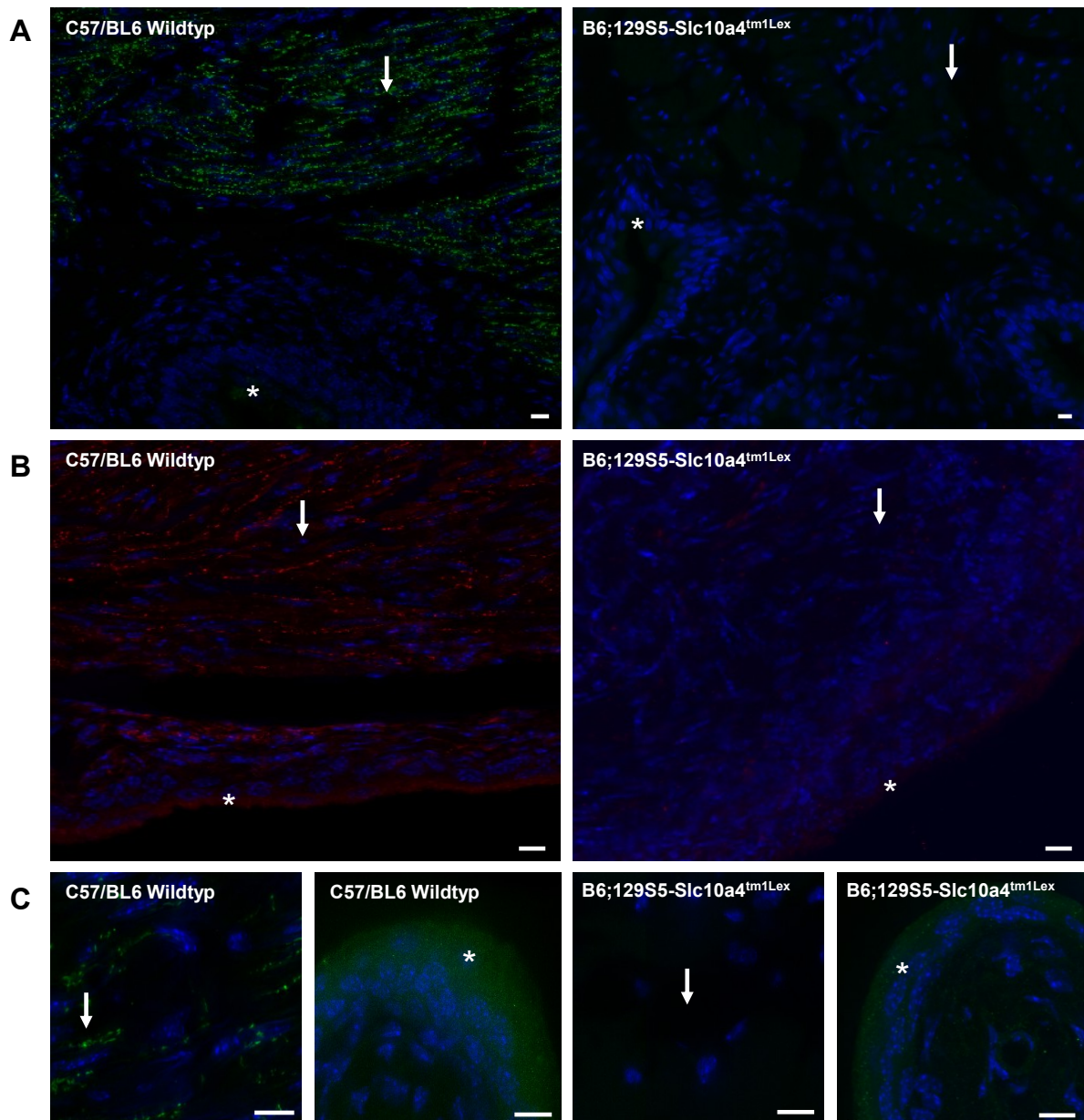


Abb. 4.27: Expression von Slc10a4 in der Harnblase einer C57BL/6 Wildtypmaus und einer B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus

Die Proteinexpression von mSlc10a4 wurde mittels Immunfluoreszenzaufnahmen histologischer Harnblasenschnitte vergleichend an C57BL/6 Wildtyp- und B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Mäusen untersucht. Als Primärantikörper wurde der Anti-Slc10a4 Antikörper (1:500) verwendet. Detektiert wurde zum einen mit dem Alexa Fluor 488-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper (**A**, **C**, in grün dargestellt) in einer Verdünnung von 1: 800 und zum anderen mit dem Cy3-gekoppelten Esel anti-Kaninchen Sekundärantikörper (**B**, in rot dargestellt) ebenfalls in einer Verdünnung von 1:800. Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI/PBS (1:5000) durchgeführt (in blau dargestellt). Für mSlc10a4 waren bei der Wildtypmaus deutliche Signale in den Innervationen des *Musculus detrusor vesicae* (Pfeile) erkennbar, welche in der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus nicht mehr detektierbar waren. Das Urothel zeigt bei beiden Mauslinien eine Hintergrundfärbung (Sternchen). Maßstab= 10 µm.

Wie bereits in Immunfluoreszenzaufnahmen an Harnblasenschnitten der Ratte gezeigt, gibt es auch bei der C57BL/6 Wildtypmaus deutliche Signale für mSlc10a4 in parasymphatischen Innervationen der glatten Muskulatur. Diese Fluoreszenzsignale für mSlc10a4 sind in der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus nicht mehr nachweisbar. Auch wenn unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet wurden, ist die Anfärbung des Urothels bei beiden Mauslinien vorhanden. Es scheint sich um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu handeln. Der verwendete anti-Slc10a4 Antikörper wurde für die Spezies Ratte hergestellt. Er bindet nicht nur an das am C-Terminus lokalisierte Epitop (VGTDDLVLMMETTQTSL) von rSlc10a4 sondern erkennt auch das Epitop (VGTDDLVMETTQTAL) der Maus spezifisch. Folglich konnte die erfolgreiche Deletion auch auf Proteinebene bestätigt werden.

4.7 Rückkreuzung der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus

Die Rückkreuzung der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus auf den Hintergrundstamm C57BL/6NTac wurde im Januar 2012 begonnen. Als erstes erfolgte eine Verpaarung der heterozygoten Männchen der F₁-Generation (Nr. 251, 250 TierBase), welche wir von TIGM erhielten, mit 8 Weibchen des Mausstammes C57BL/6NTac (Taconic Europe). Dadurch wurden das X-Chromosom und die mitochondriale DNA des Rezipientenstammes im Genom des entstehenden kongenen Stamm verankert. Die Anzahl der Nachkommen pro Wurf wurde mit durchschnittlich 5 Jungtieren angegeben. Von diesen berechneten 40 Jungtieren sollten folglich nach der Mendelschen Regel der Verteilung der Genotypen (+/+, +/-) und der Geschlechterverteilung (männlich, weiblich) insgesamt 10 männliche, heterozygote Mäuse pro Generation geboren werden. Aus dieser Gruppe von Mäusen wurden dann mittels *Speed Congenics* Analyse zwei Mäuse bestimmt und für die Zucht der nächsten Generation empfohlen. Die Anpaarung erfolgte, sobald die männlichen Mäuse das Alter von 8 Wochen erreicht hatten in einer 2:1 Verpaarung. Bei der Rückkreuzung der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus gab es Abweichungen in der Anzahl der Jungtiere pro Wurf und folglich auch in der Anzahl der zur *Speed Congenics* Analyse eingesendeten Biopsieproben der

männlichen Mäuse (4-10 Proben). Der Verlauf der Rückkreuzung ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Konventionell		Speed Congenics					
Generation	% C57BL/6NTac	Tier -Nr.	% C57BL/6NTac	NE	Tier -Nr.	% C57BL/6NTac	NE
F1	50%	251	50%	-	250	50%	-
N2	75%	313	84,31%	3	303	87,29%	3
N3	87,50%	361	93,28%	4	351	95,39%	4
N4	93,75%	368	97,68%	5	375	96,67%	5
N5	96,88%	424	99,20%	7	423	98,11%	6

Tab. 4.5: Rückkreuzung der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus

Dargestellt ist der Vergleich zwischen konventioneller Rückkreuzung und der in dieser Arbeit verwendeten *Speed Congenics* unterstützten Rückkreuzung. Aufgelistet sind für jede Generation die beiden empfohlenen Mäuse und der dazugehörige prozentuale Anteil des ungekoppelten Genoms am Rezipientenstamm C57BL/6NTac. Die prozentuale Angabe ermöglichte eine Einordnung in das Generationsäquivalent (NE). Um die Nachvollziehbarkeit zu gewährleisten sind die Mäuse mit ihrer fortlaufenden TierBase Nummer gekennzeichnet.

Die ersten vier Verpaarungen wurden unterstützt durch *Speed Congenics* bis zu einem Generationsäquivalent von NE 7 durchgeführt. Im Vergleich zu einer konventionell durchgeführten Rückkreuzung war es möglich zwei Generationen zu überspringen. Wenn man hier das Generationsintervall von 10-14 Wochen pro Generation in Betracht zieht, war dies eine Zeitersparnis von ca. 6 Monaten. Leider konnte das Männchen Nr. 424 aufgrund ungeklärter Todesursache nicht in der Zucht eingesetzt werden. Deshalb wurde nur das Männchen 423 eingesetzt. Aus diesem Wurf wurde ein heterozygotes Weibchen (NE 7) mit einem C57BL/6NTac Männchen verpaart um das Y-Chromosom des Rezipientenstammes zu verankern. Momentan werden heterozygote Männchen aus diesem Wurf (NE 8) erneut mit C57BL/6NTac Weibchen verpaart um eine Expansion der Mauslinie zu erreichen. Die geplanten weiterführenden Experimente werden mit Geschwistern aus heterozygoten Verpaarungen durchgeführt.

4.8 Phänotypisierung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus

Das Hauptaugenmerk im Zusammenhang mit der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus lag in dieser Arbeit in der Etablierung der Mauslinie und der Rückkreuzung auf einen einheitlichen genetischen Hintergrund als Basis für alle sich anschließenden Experimente. Die Rückkreuzung wurde kurz vor der Fertigstellung dieser Arbeit abgeschlossen. Deshalb handelt es sich bei den bisherigen Ergebnissen um vorläufige Daten, welche nun mit der rückgekreuzten Maus verifiziert werden müssen. Es wurden bereits während der Rückkreuzung heterozygote Mäuse verpaart, um homozygote Knockout-Tiere für die immunhistologische Untersuchung zu bekommen. Diese wurden vorher einer pathologisch-anatomischen Untersuchung unterzogen, bei welcher keine pathologischen Befunde auffällig waren. Bei der Generierung einer konstitutiven Knockout-Maus wird ein Gen vollständig und dauerhaft deletiert. Dies kann je nach Bedeutung des Gens zu einer frühen embryonalen Letalität führen (Guan et al. 2010). Die B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus hingegen ist ohne auffällige Beeinträchtigungen lebensfähig.

4.9 Belastungsbeurteilung

Die Zucht genetisch veränderter Tiere unterliegt mit Inkrafttreten des neuen Tierschutzgesetzes am 12. Juli 2013 der Genehmigungspflicht, wenn die genetische Veränderung zu Schmerzen, Leiden oder Schäden führt. Die Europäische Kommission etablierte eine Expertengruppe der Europäischen Kommission um die Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere zu erleichtern, welche das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in einem hierzu veranstalteten Workshop „Arbeitspapier zu genetisch veränderten Tieren“ ins Deutsche übersetzte und um Empfehlungen ergänzte. Es diente als Grundlage für die Belastungsbeurteilung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus. In der abschließende Beurteilung der Belastung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus wurde diese als genetisch verändertes Versuchstier ohne einen wahrscheinlich belastenden Phänotyp beschrieben. Folglich ist die Zucht nach derzeitiger Auffassung nicht tierschutzrechtlich genehmigungspflichtig.

5 Diskussion

5.1 Expressionssysteme für die funktionelle Charakterisierung des *orphan carriers* SLC10A4

Die Funktion eines *orphan carriers* aufzuklären ist eine interessante und spannende Aufgabe. Eine Voraussetzung dafür ist die Wahl eines geeigneten Expressionsmodells und möglicher Kandidatensubstrate. Hinweise auf potenzielle Substrate und damit eine physiologische Funktion geben die Zuordnung von SLC10A4 in die SLC10-Familie und die spezifische anatomische Lokalisation von SLC10A4.

Auch wenn es sich bei SLC10A4 um ein neuronales Protein handelt, dessen Funktion möglicherweise nur in einer neuronalen Zelllinie darstellbar ist, wurden die Transportstudien in nicht-neuronalen transient oder auch stabil transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt, da sich die Expression und Charakterisierung in nicht-neuronalen Zellen bereits für andere Neurotransmittertransporter als ein etabliertes *in vitro* Zellmodell erwiesen hat (Liu et al. 1992, Erickson et al. 1992, Merickel & Edwards 1995, Miller et al. 2001, Sitte et al. 2002, Ribeiro et al. 2003, Cao et al. 2014). Ausschlaggebend für diese Entscheidung war gleichermaßen, dass die bereits in anderen Dissertationen untersuchten neuronalen Zelllinien NS20Y (Neuroblastomzellen der Maus), SH-SY5Y, CAD (katecholaminerge Tumorzellen der Maus) eine sehr hohe endogene Expression von *mSlc10a4/SLC10A4* besitzen, in Kombination mit teilweise sehr schlechten Transfektionsraten (SH-SY5Y), weshalb die Generierung einer Negativkontrolle durch Herunterregulierung des SLC10A4 mittels siRNA-Transfektion bisher nicht gelungen ist. Problematisch war auch, dass neuronale Zellen für das Waschprozedere, welches am Ende der Aufnahmemessungen mit radioaktiv-markierten Substanzen steht, eine zu geringe Adhäsion besitzen und sich leicht ablösen (NS20Y, CAD). Eine Beschichtung der Zellkulturplatten mit Kollagen, Poly-D-Lysin, wie bei den HEK293-Zellen, führte zu keiner Verbesserung des Adhäsionsverhalten. Die HEK293-Zellen hingegen zeigten eine starke Adhäsion auch nach mehrmaligen Waschschritten und, was noch viel wichtiger war, sie waren aufgrund einer geringeren endogenen Expression, durch eine transiente/stabile Transfektion zu einer deutlichen Überexpression von SLC10A4 fähig. Die Expression von *rSlc10a4/SLC10A4* in HEK293-Zellen ist nicht nur in intrazellulären Kompartimenten detektierbar (Abb. 4.5), sondern zu einem geringeren Anteil auch in der Plasmamembran (Geyer et al. 2008, Bijmans et al. 2012). Deshalb wurde zum einen eine an unserem Institut bereits etablierte Methode verwendet, mit der man den Transport von radioaktiv-markierten Substanzen über die Plasmamembran in den Intrazellularraum messen kann und zum anderen eine Methode

gesucht, die es ermöglichte vesikuläre Transporter in Zellen zu charakterisieren. Am geeignetsten schien dann eine bereits bekannte Methode für die Charakterisierung vesikulärer Transporter, nämlich die Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin in Kombination mit einer anschließenden Aufnahmemessung in einem Puffer, welcher dem intrazellulären Milieu angepasst ist (Erickson et al. 1992). Damit ermöglicht man Substraten, welche normalerweise die Barriere der Zellwand nicht oder nur langsam über passive Diffusion passieren, den Zugang zum Intrazellularraum. Sie können dann von vesikulären Transportern in Vesikeln akkumuliert und so Unterschiede in der Aufnahme der Substrate detektiert werden. Digitonin ist ein Steroidglykosid und interagiert spezifisch mit Cholesterol in der eukaryotischen Plasmamembran, indem es Poren formiert, welche für Ionen und kleine Moleküle permeabel sind, gleichzeitig aber die Architektur der Plasmamembran einer intakten Zelle bewahrt (Liang et al. 2009). Unterschiedliche Konditionen für die Permeabilisierung von HEK293-Zellen wurden bereits beschrieben (Liang et al. 2009) und für unsere Messungen optimiert, welches in einer Vorinkubation mit 15 μ M Digitonin für 10 min resultierte.

Die Expression von Proteinen und ihre funktionelle Untersuchung in *X. laevis* Oozyten ist ein sehr häufig verwendetes *in vitro* Expressionssystem und wurde bereits 1971 beschrieben (Gurdon et al. 1971). Auch Neurotransmittertransporter wie z. B. der CHT1 (Okuda & Haga 2000) und der rDat (Shimada et al. 1991) wurden in *X. laevis* Oozyten charakterisiert. In früheren Studien wurde an unserem Institut die Erfahrung gemacht, dass die Transportrate für bestimmte Transporter im Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten höher sein kann als im transfizierten Zellkulturmodell bzw. das *Sorting* einiger Transporter in die Zellmembran der Oozyten effektiver ist als in die Plasmamembran von Zellkulturen. Deshalb wurden für SLC10A4 und rSlc10a4 Aufnahmestudien mit einem großen Spektrum verschiedener Neurotransmitter und weiterer Kandidatensubstrate an *X. laevis* Oozyten durchgeführt. Voraussetzung für die Aufnahmestudien in Oozyten war eine Proteinexpression von rSlc10a4 in der Plasmamembran, was bereits in früheren Studien publiziert wurde (Geyer et al. 2008). Für alle Expressionsmodelle gilt, dass immer versucht wurde, eine Positivkontrolle in dem jeweiligen Modell mitzuführen, um prinzipielle Fehler in der verwendeten Methode auszuschließen.

5.2 SLC10A4 und die Substrate der SLC10-Familie

SLC10A4 ist ein Mitglied der SLC10-Familie, welche auch bekannt ist als die Familie der Na⁺-abhängigen Gallensäuretransporter. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich auch bei SLC10A4 um einen Gallensäuretransporter handelt (Hagenbuch & Dawson 2004). Aufgrund der nahen phylogenetischen Verwandtschaft zwischen SLC10A4 und dem Gallensäuretransporter der Leber NTCP und einer Sequenzidentität von 29,7 % wurde eine ähnliche Funktion bzw. ein Transport der gleichen Substrate vermutet. Die daraufhin durchgeführten Aufnahmemessungen mit dem rSlc10a4 in *X. laevis* Oozyten und HEK293-Zellen zeigten jedoch keine vermehrte Aufnahme der NTCP-Substrate TC, E₁S, DHEAS, PREGS (Geyer et al. 2008). Die Wiederholung der Versuche in den gleichen Expressionssystemen zeigten in dieser Arbeit auch für das humane SLC10A4 Protein die gleichen Resultate. SLC10A4 ist in den bisher durchgeführten Versuchen kein Transporter für die GS TC und LC. Die von NTCP und SOAT transportierten Steroidsulfate DHEAS, PREGS und E₁S sind auch im ZNS aktiv und werden deshalb zu den neuroaktiven Steroiden gezählt. Diese werden entweder im Nervengewebe (Neurosteroiden) *de novo* oder in peripheren endokrinen Drüsen (Steroidhormone) synthetisiert und besitzen wichtige modulatorische Effekte auf die Gehirnfunktion, wie z. B. die Beeinflussung der Freisetzung verschiedener Neurotransmitter (Baulieu 1998, Mellon & Griffin 2002, Zheng 2009). Neurosteroiden können ein großes Spektrum unterschiedlicher, physiologischer Funktionen beeinflussen. Dazu gehören Nahrungsaufnahme, Reproduktion, Gedächtnis und Wahrnehmung, aber auch Gehirnentwicklung, Neurogenese und Neuroprotektion (Vallée et al. 1997, Baulieu 1998, Wolf & Kirschbaum 1999, Frye 2001, Johansson et al. 2002, Darnaudéry et al. 2002, Zheng 2009). Für diese Arbeit waren die Neurosteroiden von besonderem Interesse, da sie auf zellulärer Ebene die synaptische Transmission fast aller klassischen Neurotransmitter (GABA, Glutamat, ACh, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin) modulieren können, indem sie die Empfindlichkeit der postsynaptischen Rezeptoren oder die präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung verändern (Zheng 2009). Im *Hippocampus* wird z. B. die Freisetzung von ACh aus Neuronen durch DHEAS (Rhodes et al. 1996) und auch durch PREGS (Darnaudéry et al. 2000) erhöht. Aufgrund der dominanten mRNA-Expression von SLC10A4/Slc10a4 im Gehirn von Mensch, Ratte und Maus (Geyer et al. 2008) und der Verwandtschaft zu NTCP und SOAT, welche beide DHEAS und PREGS in ihrem Substratspektrum beinhalten, wurden auch diese beiden Neurosteroiden als mögliche Kandidatensubstrate für SLC10A4 untersucht. Die Aufnahmemessungen in *X. laevis* Oozyten und HEK293-Zellen zeigten jedoch keine vermehrte Aufnahme dieser beiden Substanzen durch das humane SLC10A4, was auch schon für rSlc10a4 publiziert wurde (Geyer et al. 2008).

5.3 SLC10A4: ein aktivierbarer Gallensäuretransporter ?

Eine japanische Arbeitsgruppe stellte kürzlich die Hypothese auf, dass die Protease Thrombin die N-terminale Domäne von SLC10A4 abschneidet und dadurch die Transportaktivität von SLC10A4 für die GS TC und LC aktiviert (Abe et al. 2013). Diese Experimente wurden in neuronalen TE671-Zellen durchgeführt, einer humanen Medulloblastomzelllinie, welche SLC10A4 endogen exprimiert. Die Zellen wurden vor den Aufnahmemessungen mit 1 Unit Thrombin/ 200 µl Transportpuffer über 3 h vorinkubiert, mit den GS TC, LC, Chenodeoxycholat und Deoxycholat sowie dem sulfatierten Steroid E₁S inkubiert. Über Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) konnte nur eine Akkumulation der GS TC und LC festgestellt werden. Nach einer zielgerichteten Abschaltung der endogenen SLC10A4-Expression der TE671-Zellen durch die Transfektion eines siRNA-Plasmids, war keine Akkumulation von LC und TC mehr nachweisbar, was als ein Beweis für eine spezifische Aufnahme über SLC10A4 dargelegt wurde (Abe et al. 2013). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde dieser Versuchsaufbau von uns in stabil SLC10A4- oder NTCP-exprimierenden HEK293-Zellen und auch in *X. laevis* Oozyten nachgestellt, welche transfiziert waren mit SLC10A4 und NTCP als Positivkontrolle. Die Vorinkubation der Zellen wurde nach dem oben genannten Prinzip durchgeführt, wobei die Aufnahmemessungen mit radioaktiv-markierten GS durchgeführt wurden. Wie erwartet, zeigte der NTCP in den HEK293-Zellen und in den *X.laevis* Oozyten eine signifikante Transportaktivität für TC, jedoch nicht für LC und war auch nicht durch die Vorinkubation mit Thrombin zu beeinflussen. Die Transportaktivität von SLC10A4 für die GS TC und LC konnte in beiden Expressionssystemen nicht durch die Vorbehandlung mit Thrombin aktiviert werden. Zusätzlich zeigte SLC10A4 auch keinen aktivierbaren Transport der Steroidsulfate DHEAS und PREGS in den HEK293-Zellen. Zwischen SLC10A4 und den anderen Mitgliedern der SLC10-Familie gibt es einige strukturelle Unterschiede; das SLC10A4-Protein enthält nicht das Signaturmotiv ALGMMPL und im Vergleich zum NTCP besitzt SLC10A4 eine zusätzliche N-terminale Domäne von ca. 60 Aminosäuren. Ob die Protease Thrombin diesen überhaupt abschneiden kann, ist fraglich. Das verwendete Enzym Thrombin ist eine Serin-Protease und schneidet Proteine an einer spezifischen Peptidschnittstelle. In dem zu untersuchenden Protein SLC10A4 soll sich laut Abe et al. (2013) diese Schnittstelle an der Position 87 des Proteins befinden, welche noch vor der ersten Transmembrandomäne liegt, und somit den extrazellulären N-Terminus abschneiden soll. Diese Aussage wurde mit dem bioinformatischen Programm *ExPASy Peptide Cutter* überprüft (Abb. 5.1) und festgestellt, dass Thrombin die Slc10a4-Proteine von Ratte und Maus an der vorhergesagten Position schneidet, jedoch nicht das humane Protein, welches in der verwendeten humanen Zelllinie TE671 endogen exprimiert wird.

	60	70	80	90
SLC10A4	GFSPGPTPTPEPTT	SGLAGGAASHG	PSFPRPWAPHALP	
mSlc10a4	GFSPPEATPTPEPT	SSSLTVGVAGQGS	SAFPRPWIPHEPP	
rSlc10a4	GFSPDLTPTPEPT	SSSLAGGVAGQDS	STFPRPWIPHEPP	

Abb. 5.1: Alignment von SLC10A4/Slc10a4 (Mensch, Maus, Ratte) für die Darstellung der berechneten Thrombinschnittstellen

Die Proteinsequenzen von SLC10A4/Slc10a4 (Mensch, Maus, Ratte) wurden einzeln mit dem *ExPASy Peptide Cutter* Programm auf berechnete Thrombinschnittstellen (schwarzes Dreieck) untersucht. Diese wurden dann zur Übersicht in einem Ausschnitt des Alignments dargestellt. Der Marker verschiebt sich aufgrund des Abgleichs mit SLC10A4 um zwei Positionen nach rechts, weshalb die Schnittstelle an Position 89 angezeigt wird anstatt an Position 87.

Als Beweis für das gelungene Abschneiden des N-Terminus wurden in der genannten Arbeit verminderte Fluoreszenzsignale des gegen den N-Terminus gerichteten Antikörpers in der immunzytologischen Untersuchung der Zellen angeführt. Diese wirkt allerdings nicht überzeugend, da nur ein Bruchteil der Signale tatsächlich verloren geht (Abe et al. 2013). Der C-terminale Antikörper hingegen dürfte in nicht-permeabilisierten Zellen keine spezifische Anfärbung bewirken, da sich der C-Terminus intrazellulär befindet (Geyer et al. 2008). Ebenfalls zu beachten sind die Effekte der Substanzen, mit welchen die neuronalen TE671-Zellen inkubiert wurden. Diese wurden deshalb einer näheren Betrachtung unterzogen. Thrombin ist eine Serinprotease und eine essentielle Komponente in der Koagulationskaskade (Hua et al. 2007). Es kann Neurone und Astrozyten *in vitro* abtöten (Xi et al. 2003), wobei der toxische Effekt von Thrombin auf eine gemischte Neuronen/Astrozyten-Kultur konzentrationsabhängig ist und bei einer Konzentration von 5 U Thrombin/ml über 24 h beginnt (Jiang et al. 2002). Eine Konzentration von 10 U Thrombin/ml über 30 min wird toleriert (Striggow et al. 2000). Ob und in welchem Ausmaß die Inkubation mit 5 U Thrombin/ml über einen Zeitraum von 3 h (wie bei Abe et al. 2013) einen toxischen Einfluß auf die neuronalen TE671-Zellen besitzt und inwiefern dieser die Zellmembranpermeabilität beeinflusst, ist fraglich. Jedoch stellt diese eine weitere unbekannte Variable dar, welche eine direkte Zuordnung der vermehrten Akkumulation von TC und LC als eine spezifische Funktion von SLC10A4 erschwert. Des Weiteren wurde die Behauptung aufgestellt, dass LC über den durch Thrombin-aktivierten SLC10A4 in den Intrazellularraum gelangt und dort die Apoptose intrazellulär triggert. Als Beweis dafür wurde die Zellviabilität der TE671-Zellen nach Inkubation mit Thrombin und LC bestimmt und festgestellt, dass eine Vorbehandlung mit Thrombin die toxischen Effekte von LC verstärkt (Abe et al. 2013). Jedoch ist bekannt, dass LC selektiv neuronale Tumorzellen schädigt, indem es an die Zelloberfläche bindet und dort die intrinsische und extrinsische Apoptose-Signalkaskade triggert (Goldberg et al. 2011). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die

publizierte Funktion von SLC10A4, ein durch die Protease Thrombin aktivierbarer Gallensäuretransporter zu sein, sehr kritisch zu betrachten ist. Die Ergebnisse könnten sich auch aus einem rein additiven Effekt, der beiden Substanzen Thrombin und LC an sich erklären lassen und auch die Abbildung der für LC und TC dargestellten Transportkinetik gleicht eher der einer linearen Permeation, als der eines Carrier-vermittelten Transportes.

5.4 SLC10A4: ein Wiederaufnahmetransporter für monoaminerge oder cholinerge Neurotransmitter?

Da rSlc10a4 in der präsynaptischen Membran cholinerg und monoaminerg Neurone exprimiert wird (Burger et al. 2011), war eine Hypothese, dass es sich bei SLC10A4 um einen Wiederaufnahmetransporter handelt, welcher Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt zurück in die präsynaptische Nervenendigung transportiert.

5.4.1 Dopamin, Noradrenalin und Serotonin

SLC10A4/rSlc10a4 wird im Gehirn sehr stark in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* (Burger et al. 2011) und auch in serotonergen Neuronen der *Nuclei Raphe* und noradrenergen Neuronen des *Locus coeruleus* exprimiert (Popova & Alafuzoff 2013). Aufgrund dieser Lokalisation wurde untersucht, ob es sich bei SLC10A4 um einen *Reuptake*-Transporter für die Substanzen Dopamin, Noradrenalin und Serotonin handelt.

Dopamin führt seine Funktion über eine relativ langsame Modulation der schnellen Glutamat- und GABA-vermittelten Neurotransmission aus. Zu den vier identifizierten dopaminergen Bahnen im Gehirn zählen die nigrostriatale, die mesolimbische, die mesokortikale und die tuberoinfundibuläre Bahn. Diese Neurone sind bedeutend involviert in die Erhaltung lebenswichtiger Funktionen im ZNS, einschließlich der willkürlichen Bewegung, der Nahrungsaufnahme, der positiven Verstärkung und Emotionen, der Schlafregulation, der Aufmerksamkeit, dem Arbeitsgedächtnis und Lernvermögen (Beaulieu & Gainetdinov 2011). Außerdem besitzt Dopamin eine Schlüsselrolle bei neurologischen Erkrankungen und psychiatrischen Störungen, wie M. Parkinson, Tourette-Syndrom, Schizophrenie und manisch-depressiven Erkrankungen (Giros et al. 1992). Da sich die Expression von SLC10A4 in HEK293-Zellen zu einem geringen, aber detektierbaren Anteil in der Plasmamembran befindet und die plasmamembranständige Expression von Slc10a4 in *X. laevis* Oozyten bereits gezeigt wurde (Geyer et al. 2008), wurden die Aufnahmeversuche in diesen beiden Expressionsmodellen durchgeführt. Als Positivkontrollen für die Aufnahme von Dopamin und Noradrenalin wurde der Dopamintransporter verwendet, welcher im Gehirn selektiv in dopaminergen Neuronen exprimiert wird, die höchste mRNA-Expression in der

Substantia nigra und der *Area tegmentalis ventralis* besitzt (Ciliax et al. 1995) und nicht nur Dopamin, sondern auch Noradrenalin transportiert (Giros et al. 1992, 1994). Die Aufnahme von Dopamin ist für DAT in HEK293-Zellen bereits beschrieben (Sitte et al. 2002) und war auch in unseren Experimenten in transient und auch stabil transfizierten DAT-HEK293-Zellen, Na⁺-abhängig und sensitiv für den verwendeten Inhibitor Nomifensin. Die SLC10A4-HEK293-Zellen zeigten in einem Teil der Versuche eine vermehrte Akkumulation, diese war jedoch in den Wiederholungsversuchen nicht deutlich reproduzierbar und in der statistischen Gesamtauswertung nicht signifikant. Dieser Effekt lässt sich nicht mit Sicherheit erklären. Man könnte jedoch vermuten, dass die Expression von SLC10A4 in der Plasmamembran der HEK293-Zellen aus bisher unbekannten Gründen schwankt, und diese sich auch in den funktionellen Messungen widerspiegelt. In den *X. laevis* Oozyten hingegen waren keine Schwankungen in der Aufnahme von Dopamin sichtbar und es konnte kein Transport für Dopamin über SLC10A4 nachgewiesen werden. Damit konnte SLC10A4 im Rahmen dieser Arbeit nicht als Dopamin-Transporter etabliert werden.

Noradrenalin ist ebenfalls ein wichtiger chemischer Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem und reguliert eine große Auswahl an physiologischen Prozessen, einschließlich der Gemütslage, dem Erregungszustand, dem Lern- und Erinnerungsvermögen, der Durchblutung und dem Metabolismus. Im ZNS wird ein Großteil des Noradrenalins im *Locus coeruleus* und *subcoeruleus* wie auch in einigen anderen Nervenkernen synthetisiert, deren noradrenerge Projektionen in geradezu allen Regionen im Mittelhirn, basalen Vorderhirn und Kleinhirn identifiziert wurden (Xu et al. 2000). Die Aufnahme von Noradrenalin konnte in den DAT-HEK293-Zellen dargestellt werden, jedoch zeigte sich keine vermehrte Akkumulation in die SLC10A4-HEK293-Zellen. Folglich konnte auch Noradrenalin nicht als Substrat für SLC10A4 identifiziert werden.

Serotonin ist ein Neurotransmitter, der zahlreiche Funktionen im Gehirn, wie Kognition, Emotionen, Motivation, Nahrungsaufnahme, Nozizeption und Schlafregulation und Funktionen in der Peripherie (z. B. intestinale Funktion) beeinflusst (Haenisch & Bönisch 2011). Die Ursprungsgebiete des zentralen serotonergen Systems befinden sich in den *Nuclei raphe*s (Qian et al. 1995). Als Postitivkontrolle für die Aufnahme von Serotonin wurde der SERT verwendet, welcher in der präsynaptischen Plasmamembran serotonerger Neurone lokalisiert ist und Serotonin Na⁺- und Cl⁻-abhängig aus dem Extrazellularraum zurück in das Innere des Neurons transportiert (Blakely et al. 1998). Da SERT sensitiv für Antidepressiva ist (Ramamoorthy et al. 1993), wurde in diesen Studien Citalopram, ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), als Inhibitor verwendet. Essentiell für die Aufnahmemessungen mit Serotonin war die Zugabe von 100 µM Ascorbinsäure (Antioxidans) und 100 µM Pargylin, einem Monoaminoxidasehemmer, welcher den vorzeitigen Abbau von Serotonin hemmt. In früheren Studien konnte der SERT in stabil

transfizierten HEK293-Zellen bereits charakterisiert werden (Qian et al. 1997). Dies ließ sich auch in unseren Experimenten mit transient transfizierten HEK293-Zellen darstellen. Allerdings konnte für SLC10A4 keine Aufnahme von Serotonin in HEK293-Zellen und keine replizierbare, signifikante Aufnahme in *X. laevis* Oozyten, welche mit SLC10A4/rSlc10a4-cRNA injiziert wurden, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse in den HEK293-Zellen stimmen überein mit den erst kürzlich generierten Transportdaten für Dopamin, Serotonin und Acetylcholin in transient transfizierten HEK293-Zellen (Larhammar et al. 2014).

5.4.2 Cholin und Acetat

Nach der exozytotischen Freisetzung in den synaptischen Spalt wird Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase zu Acetat und Cholin hydrolysiert. Cholin permeiert nicht durch die Zellmembran, sondern benötigt für die Wiederaufnahme in das Zytosol und die erneute Synthese von Acetylcholin, den membranständigen Cholintransporter (Okuda et al. 2000, Apparsundaram et al. 2000, Okuda & Haga 2000). Da auch rSlc10a4 in zentralen und peripheren cholinergen Neuronen exprimiert wird (Geyer et al. 2008), wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei SLC10A4 um einen *Reuptake*-Transporter für Cholin oder Acetat handeln könnte. Die heterologe Expression in HEK293-Zellen ergibt für beide Proteine, SLC10A4 und CHT1 eine vermehrte Expression in intrazellulären Kompartimenten und nur eine geringe Expression in der Plasmamembran (Ribeiro et al. 2003, Geyer et al. 2008). Jedoch lässt sich die HC-3-sensitive und natriumabhängige Aufnahme von Cholin über CHT1 trotz der geringen Membranexpression in HEK293-Zellen darstellen und wurde deshalb als Positivkontrolle verwendet (Ribeiro et al. 2003). Wie bereits für das Rattenprotein demonstriert (Geyer et al. 2008), so zeigt auch das humane SLC10A4 keinen Transport von Cholin in den HEK293-Zellen und in den *X. laevis* Oozyten. Auch Acetat wird in den *X. laevis* Oozyten nicht von SLC10A4 transportiert.

5.5 SLC10A4: ein vesikulärer Transporter für Monoamine?

5.5.1 Serotonin, Dopamin und Noradrenalin

VMAT2 ist für die Speicherung aller Monoamine in synaptischen Vesikeln im ZNS verantwortlich (Eiden & Weihe 2011). In der Präsynapse monoaminerger Neurone wurde eine Kolo-kalisation von rSlc10a4 mit VMAT2 nachgewiesen (Burger et al. 2011). Aufgrund dieser Lokalisation wurden die Monoamine Serotonin, Dopamin und Noradrenalin als mögliche Kandidatensubstrate für SLC10A4 in Betracht gezogen und in den digitonisierten, stabil transfizierten HEK293-Zellen gemessen. Die Überexpression von VMAT2 und

SLC10A4 wurde vorher mittels quantitativer Real-Time PCR (Abb. 4.6) und Immunfluoreszenz (Abb. 4.5) bestätigt. VMAT2 konnte auch in den nicht-neuronalen HEK293-Zellen charakterisiert werden. Dies wurde auch schon für andere Zelllinien nicht-neuronalen Ursprungs gezeigt, wie z. B. die CV-1-Zellen (Erickson et al. 1992) und die COS-1-Zellen (Merickel & Edwards 1995). Somit kann ein vesikulärer Neurotransmittertransporter auch in Zelltypen, welche keine synaptischen Vesikel enthalten funktionell aktiv sein. Da man weiß, dass viele synaptische, vesikuläre Proteine in heterologen Expressionssystemen im endosomalen System gefunden werden (Prado et al. 2002) und der Transport von VMAT2 vor allem vom Protonengradienten abhängig ist, werden die Substrate wahrscheinlich in saure, intrazelluläre Kompartimente, wie z. B. dem Golgi-Komplex, Lysosomen oder Endosomen akkumuliert (Liu et al. 1992). Im Vergleich dazu zeigte SLC10A4 keine Aufnahme von Serotonin, Noradrenalin, Dopamin in dieser vesikulären Transportmessung (Abb. 4.14).

5.5.2 Acetylcholin

Der Neurotransmitter Acetylcholin ist im peripheren und zentralen Nervensystem weit verbreitet und wird in der Präsynapse aus Acetyl-CoA und Cholin durch die ChAT synthetisiert. Der vesikuläre Acetylcholintransporter ist ein *low-affinity* Transporter mit einem K_m -Wert von ca. 1 mM. Er zeigt eine ATP-abhängige Aufnahme von Acetylcholin, welche durch den spezifischen Inhibitor Vesamicol, das Protonenionophor FCCP oder durch niedrige Temperaturen (4°C) verhindert werden kann (Varoqui & Erickson 1996). Essentiell war bei diesen Messungen die Zugabe von 100 µM Paraoxon, einem irreversiblen Inhibitor der Acetylcholinesterase, um den vorzeitigen Abbau von Acetylcholin zu verhindern. Obwohl die immunzytologischen Experimente und auch die Real-Time PCR die stabile Expression von VACHT und SLC10A4 bestätigten, konnte bei den *in vitro* Aufnahmemessungen an stabil transfizierten, permeabilisierten HEK293-Zellen kein Transport von Acetylcholin durch VACHT und auch nicht durch SLC10A4 nachgewiesen werden (Abb. 4.14). Eine vermehrte Akkumulation von Acetylcholin wurde in intakten, nicht-neuronalen CV-1-Fibroblastenzellen bestätigt (Erickson et al. 1994). Allerdings war diese lediglich doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen und im Vergleich zu Studien in neuronalen PC12-Zellen, welche ein 20-fach höhere Aufnahme zeigen, sehr gering (Varoqui & Erickson 1996). Auch für die nicht-neuronale CHO-Zelllinie konnte eine Aufnahme von ACh über den VACHT gezeigt werden (Liu & Edwards 1997). Daraus lässt sich folgern, dass der VACHT in Endosomen nicht-neuronaler Zelllinien funktionell aktiv sein kann und dafür auch keine Kofaktoren benötigt (Rodrigues et al. 2013). Die Schwierigkeit, einen vesikulären Transporter wie den VACHT zu messen, könnte auch in seiner viel geringeren Substrataffinität liegen ($K_m \sim 1\text{mM}$) im

Vergleich zu der Substrataffinität des VMAT2 ($K_m < 1 \mu\text{M}$), was sich in nicht-neuronalen Zellen gut darstellen lässt (Hnasko & Edwards 2012). Auch für SLC10A4 konnte in zahlreichen Aufnahmeversuchen keine vermehrte Akkumulation von Acetylcholin gezeigt werden, wobei man nicht mit Bestimmtheit sagen kann, ob dies am gewählten Expressionsmodell scheitert, wie es beim VACHT der Fall ist, oder SLC10A4 tatsächlich kein Acetylcholin transportiert.

5.6 SLC10A4 und Mastzellen

Histamin vermittelt seine Signalübertragung durch eine große Anzahl neuronaler und nicht-neuronaler Zellen, einschließlich Mastzellen. Wie auch andere biogene Amine so wird Histamin aus sekretorischen Vesikeln freigesetzt und benötigt einen aktiven Transport aus dem Zytoplasma in die Vesikel. Dieser Transport wird von VMAT2 durchgeführt, welcher auch in Mastzellen exprimiert wird (Erickson et al. 1992, Travis et al. 2000). Das rSlc10a4-Protein wird ebenfalls in sekretorischen Granula von Mastzellen exprimiert, ist hier aber nur vereinzelt mit rVmat2 kolokalisiert (Burger et al. 2011). Es wurde deshalb untersucht, ob SLC10A4 Histamin transportiert. VMAT2 transportiert Histamin mit einer geringeren Affinität als die anderen Monoamine (Serotonin, Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin) mit einem K_m von ungefähr $24 \mu\text{M}$ in transient transfizierten, nicht-neuronalen COS-1-Zellen (Merickel & Edwards 1995). In den *X. laevis* Oozyten wurde der plasmamembranständige mOct1 als Positivkontrolle verwendet, dessen polyspezifisches Substratspektrum auch das Kation Histamin beinhaltet (Couroussé & Gautron 2014). Dieser zeigte eine signifikante Aufnahme von Histamin im Vergleich zu den H_2O -injizierten Oozyten. Jedoch zeigte SLC10A4 auch in diesem Expressionsmodell keinen Transport von Histamin (Abb. 4.19).

5.7 SLC10A4: ein alternativer Transporter für die exzitatorischen Neurotransmitter Aspartat und Glutamat?

Während der Erforschung der verschiedenen Neurotransmitter war die vorherrschende Idee die, dass ein Neuron nur einen Neurotransmitter freisetzt, dementsprechend wurden auch die Nervenbahnen nach den Neurotransmittern benannt, welche in ihren Synapsen detektiert wurden (z. B. cholinerg). Die „ein Neuron - ein Transmitter-Idee“, die heute üblicherweise als „Dale’s Prinzip“ bezeichnet wird, wurde durch den Neurophysiologen John Eccles etabliert (Strata & Harvey 1999). Einige Jahre später wurde ein neues Konzept der Kotransmission publik. Diese ist definiert als das Vorhandensein von zwei oder mehr Neurotransmittern in der präsynaptischen Nervenendigung eines einzigen Neurons (Burnstock 1976). Die Signalweiterleitung an der neuromuskulären Endplatte, der Synapse zwischen Motoaxon und Muskulatur, erfolgt z.B. über die Neurotransmitter ACh und ATP (Fagerlund & Eriksson 2009). Kollaterale Abzweigungen der Motoaxone erregen inhibitorische Interneurone, die sogenannten Renshaw-Zellen (Abb. 5.2), welche durch die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter (GABA, Glycin) an denselben Motoaxonen eine negative Rückkopplung bewirken (Alvarez et al. 2013).

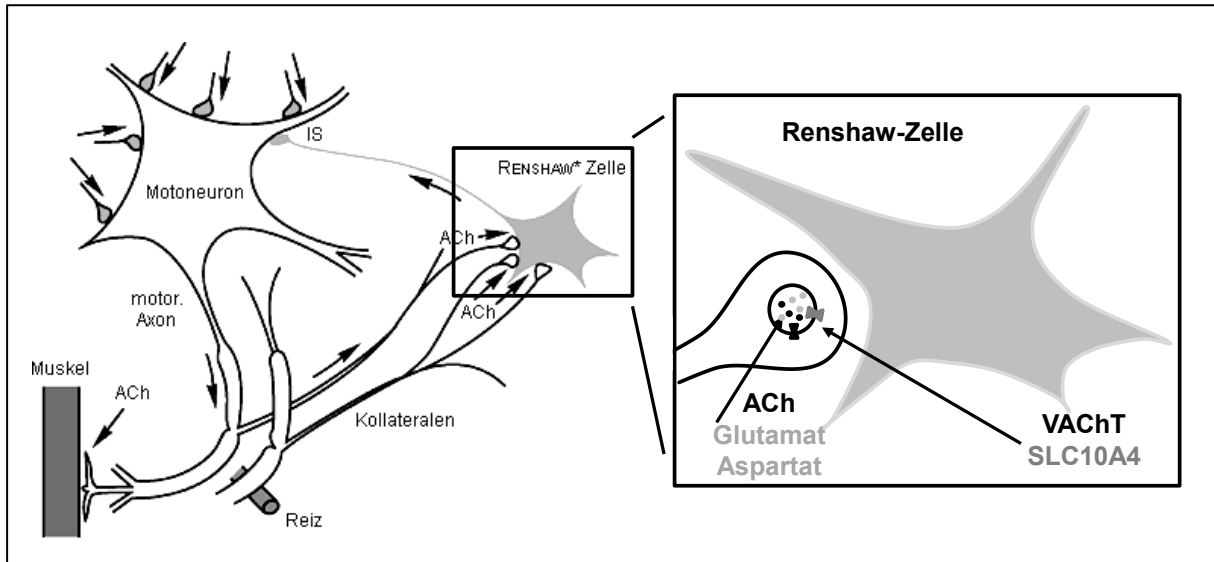


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Renshaw-Hemmung und der Lokalisation von SLC10A4

Schematische Darstellung der Motoneurone, die über ACh-Freisetzung an der neuromuskulären Enplatte die nikotinergen ACh-Rezeptoren in der Muskulatur aktivieren und über die Freisetzung von ACh und potentieller Kotransmitter (Glutamat, Aspartat) die Renshaw-Zellen erregen, welche dann über die Freisetzung inhibitorischer Transmitter die Aktivität der Motoneurone regulieren (Abbildung modifiziert nach Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage Urban&Fischer, 1999).

Von Prof. Francisco Alvarez (Wright State University, Dayton, USA) wurde die zentrale Motoneuronsynapse an Renshaw-Zellen auf die Möglichkeit einer Freisetzung der exzitatorischen Neurotransmitter Aspartat und Glutamat, zusätzlich zu dem primären Neurotransmitter Acetylcholin, untersucht (Mentis et al. 2005, Richards 2009). In immunzytologischen Untersuchungen am Licht- und auch am Elektronenmikroskop wurde in Vesikeln dieser Synapsen, zusätzlich zu Acetylcholin, ein hoher Gehalt an Aspartat und Glutamat festgestellt. Allerdings konnten weder die drei vesikulären Glutamattransporter (VGLUT1-3, SLC17A6-SLC17A8) noch der synaptische Aspartat- und Glutamattransporter Sialin (SLC17A5) nachgewiesen werden (Mentis et al. 2005, Richards 2009). Die Expression von rSlc10a4 im Rückenmark und Koloalisation mit rVacht wurde bereits gezeigt (Geyer et al. 2008) und konnte von der Alvarez-Gruppe in den Motoaxonen präsynaptisch zu Renshaw-Zellen mit dem anti-Slc10a4 Antikörper unserer Gruppe detektiert werden (Richards 2009). Im ZNS wird SLC10A4/rSlc10a4 in den dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* und der *Area tegmentalis ventralis* stark exprimiert (Jørgensen et al. 2006, Geyer et al. 2008, Zhou et al. 2011). Es ist bekannt, dass Glutamat zusammen mit Dopamin aus dopaminergen Neuronen der *Area tegmentalis ventralis* (Lapish et al. 2006) ausgeschüttet wird. Auch wenn einige der Neurone in der *Substantia nigra* VGLUT2 exprimieren (Varoqui et al. 2002) ist, je nach Studie, der prozentuale Anteil der VGLUT2 exprimierenden dopaminergen Neurone gering bis mittelmäßig ausgeprägt (0,1 %-18 %) (Kawano et al. 2006, Yamaguchi et al. 2007, Dal Bo et al. 2008). Glutamat wird auch zusammen mit ACh aus cholinergen Regionen des basalen Vorderhirns freigesetzt (Allen et al. 2006). Auch rSlc10a4 wird in cholinergen Regionen im ZNS exprimiert (Geyer et al. 2008), welche Glutamat zusammen mit ACh freisetzen, wie z. B. das diagonale *Band von Broca*, und das *mediale Septum* im basalen Vorderhirn, deren Projektion zum *Hippocampus* führen (Huh et al. 2008). Jedoch wird in diesen cholinergen Gehirnregionen keiner der bekannten VGLUT's in den synaptischen Nervenendigungen der Neuronen exprimiert (Herzog et al. 2001, Varoqui et al. 2002, Gras et al. 2002). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass Glutamat von den genannten Neuronen über einen VGLUT-unabhängigen Mechanismus transportiert wird. SLC10A4 wurde hierbei als möglicher Kandidat angesehen und könnte die vesikuläre Akkumulation der Neurotransmitter Aspartat und Glutamat in Motoneuronen vermitteln, welche Renshaw-Zellen kontaktieren (Richards 2009). Die funktionellen Aufnahmemessungen für die potentiellen Substrate Glutamat und Aspartat wurden an SLC10A4/rSlc10a4 exprimierenden *X. laevis* Oozyten durchgeführt. Allerdings konnte in diesem Expressionssystem keine erhöhte Akkumulation von Glutamat und Aspartat im Vergleich zu H₂O-injizierten Oozyten festgestellt werden (Tab. 4.4).

5.8 SLC10A4: ein Transporter für den Kotransmitter ATP?

Das Konzept der purinergen Signaltransduktion wurde 1972 eingeführt (Burnstock 1972). Zum einen agiert ATP als ein schneller exzitatorischer Transmitter und zum anderen besitzt es eine potente Langzeitwirkung auf die Zellproliferation, Wachstum, Entwicklung, Krankheiten sowie Zytotoxizität (Abbraccio et al. 2009, Burnstock 2013). Wahrscheinlich ist ATP, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen, in allen synaptischen und/oder sekretorischen Vesikeln präsent und kann zusammen mit anderen Neurotransmittern gespeichert und freigesetzt werden. Die Aufnahme von ATP und anderer Nukleotide in die Vesikel erfolgt über den VNUT (Sawada et al. 2008). Einige Gehirnregionen, wie z. B. die molekulare Schicht des *Gyrus dentatus* und das *Periaquäduktale Grau*, haben gar keine oder nur eine sehr geringe VNUT-Expression (Sreedharan et al. 2010). Da jedoch eine purinerge Neurotransmission in diesen Gebieten beschrieben wurde (Spolidório et al. 2007, Xing et al. 2008), ist es möglich, dass VNUT nicht der einzige vesikuläre Nukleotidtransporter ist. Die Expression von rSlc10a4 in den genannten Regionen (Geyer et al. 2008) und die Lokalisation in synaptischen Vesikeln monoaminerger und cholinерger Neuronen führen zu der Hypothese, dass es sich bei SLC10A4 um einen weiteren vesikulären Transporter für Nukleotide handeln könnte. Ein weiteres Kandidatensubstrat ist deshalb ATP, da es im peripheren und auch im zentralen Nervensystem als Transmitter oder Kotransmitter in sympathischen und parasympathischen Nervenzellen angesehen wird (Abbraccio et al. 2009). Zusätzlich ist ATP ein Anion, das unabhängig von seiner Rolle als Substrat, die Aufnahme von Monoaminen in die Vesikel durch VACHT und VMAT2 fördern kann, da diese vor allem vom Protonengradienten abhängig sind (Bankston & Guidotti 1996). Außerdem gibt es auch in der SLC10-Familie Anionentransporter, wie z. B. den SOAT (Geyer et al. 2004). Um diese Hypothese zu testen, wurden Aufnahmemessungen mit zwei unterschiedlich radioaktiv-markierten Substanzen durchgeführt. Zum einen wurde ein [³H]-markiertes ATP und zum anderen ein nicht-hydrolysierbares ATP-Analog [³⁵S]γ-ATP in den Expressionssystemen der *X. laevis* Oozyten und der stabil transfizierten, intakten und auch permeabilisierten HEK293-Zellen verwendet. Da die Lysosomen in HEK293-Zellen hohe ATP-Konzentrationen (~mM) enthalten (Huang et al. 2014) und auch die physiologische Konzentration von ATP im Zytosol (1-10 mM) im Vergleich zum Extrazellularraum (0,001-10 μM) sehr hoch ist (Lazarowski et al. 2011), wurde mit einer Konzentration von 5 mM und mit einer deutlich geringeren Konzentration von 5 μM gemessen. Nach der Freisetzung unterlaufen ATP und andere Nukleotide einer sehr schnellen enzymatischen Degradierung durch Ektonukleotidasen, was funktionell sehr wichtig ist, da auch ATP-Metabolite als physiologische Liganden an zahlreichen purinergen Rezeptoren agieren können. ATP und

ADP werden zu AMP hydrolysiert, welches weiter zu Adenosin und schließlich zu Inosin und Hypoxanthin abgebaut wird (Abbraccio et al. 2009, Burnstock 2013).

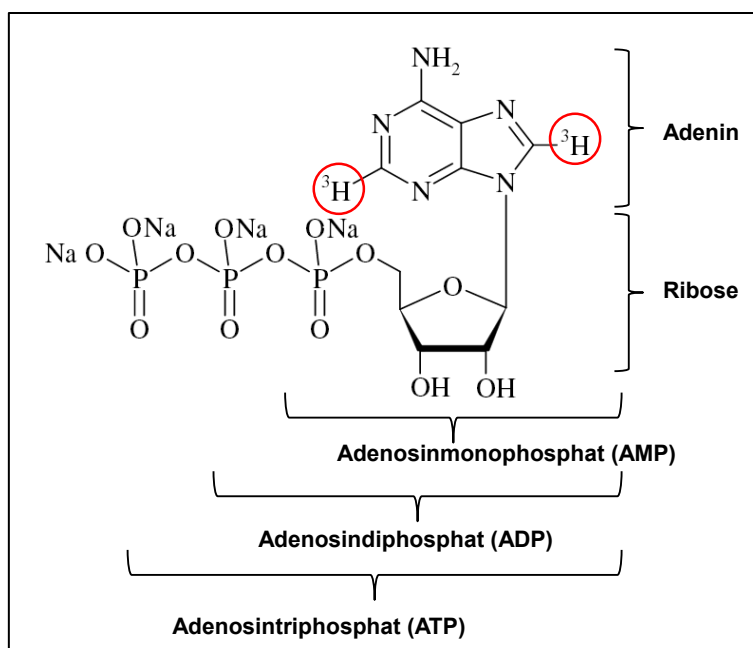


Abb. 5.3: Darstellung der Strukturformel des verwendeten [^3H]ATP's

Das für die Aufnahmeversuche verwendete ATP besitzt [^3H]-Markierungen an der Nukleinbase Adenin in Position 2 und 8. Diese verbleiben auch nach einer Hydrolyse an dem jeweiligen Metaboliten (ADP, AMP, Adenosin) (modifiziert von <http://www.perkinelmer.com>).

Deshalb wurden für die Aufnahmemessungen zuerst kurze Zeitpunkte gewählt (1, 5, 10 min), für welche in SLC10A4-HEK293 Zellen oder in SLC10A4-cRNA injizierten Oozyten keine veränderte Akkumulation von ATP im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden konnte (Abb. 4.12). Eine Erklärung für die hohen Basalwerte der ATP-Aufnahme in den HEK293-Zellen konnte durch eine erst kürzlich publizierte Studie gefunden werden. Der VNUT reichert sich in Lysosomen der HEK293-Zellen an und kann funktionell mittels ATP-Biolumineszenzmessung charakterisiert werden (Cao et al. 2014). Folglich ist in den HEK293-Zellen bereits eine endogene Expression von VNUT vorhanden, welche möglicherweise die Effekte von SLC10A4 beeinflusst oder überlagert. Anschließend an die Aufnahmemessungen mit den kurzen Zeitpunkten wurden auch Inkubationen über lange Zeitpunkte (30, 60 min) durchgeführt (Abb. 4.13). Dabei zeigte sich ein verblüffendes Ergebnis, denn bei beiden Zeitpunkten zeigten die SLC10A4-HEK293-Zellen eine signifikant verminderte Akkumulation von [^3H]-markiertem ATP im Vergleich zu den Kontrollzellen. Aus einer Reihe eleganter Versuche an HEK293-Zellen ist bekannt, dass sich der N-Terminus des rSlc10a4-Proteins extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär befindet (Geyer et al. 2008). Wenn man von einer vesikulären Expression ausgeht, befindet sich der N-Terminus folglich in dem Vesikellumen (Abb. 5.4). Eine mögliche Erklärung für die verminderte

Akkumulation von [^3H]-markiertem ATP in intakten SLC10A4-HEK293-Zellen ist, dass bei einer stark überexprimierenden Zelllinie die Expression in der Plasmamembran funktionell überwiegt und über einen langen Zeitraum ein vermehrter Efflux stattfindet, welcher sich, wenn man die Transportrichtung beibehält, in einer vesikulären Aufnahmemessung als Transport in das Lumen der Vesikel darstellen könnte. Auch für die vakuoläre H^+ -ATPase ist bekannt, dass sie ihr Substrat (Protonen) aus dem Zytosol in den Extrazellularraum transportiert, wenn sie in der Plasmamembran exprimiert ist (Carraro-Lacroix et al. 2009). Der Sialintransporter SLC17A5, welcher zu der gleichen Familie wie auch VNUT gehört, ist ein einzigartiges Protein, das seine Funktion je nach Expression ändert. In synaptischen Vesikeln transportiert es Glutamat und Aspartat, abhängig vom Membranpotential und in Lysosomen spielt es eine Rolle als H^+ /Sialin Kotransporter (Omote & Moriyama 2013). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für SLC10A4 denkbar.

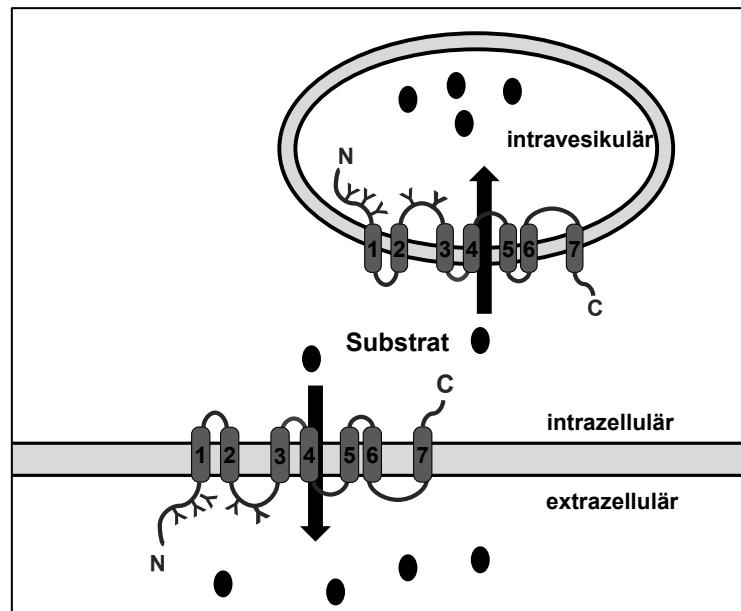


Abb. 5.4: Schematische Darstellung der Orientierung der Transmembrandomänenstruktur von SLC10A4

Die N-terminale Domäne von SLC10A4 befindet sich extrazellulär bei einer Expression in der Plasmamembran und folglich intravesikulär bei einer vesikulären Expression. Ein vermehrter Efflux eines Substrates über die Plasmamembran könnte sich in einer vesikulären Transportmessung als vermehrte Aufnahme darstellen.

5.9 Ausblick

Diese Resultate bedürfen einer weiteren Aufklärung. Wie bereits erläutert unterliegt ATP einer sehr schnellen Degradierung und es ist daher fraglich, welcher Metabolit nach den langen Inkubationszeiten tatsächlich gemessen wird. Deshalb sollten weitere Experimente mit den ATP-Metaboliten [^3H]ADP, [^3H]AMP, [^3H]Adenosin und dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analog [^{35}S] γ -ATP im gleichen Zellmodell, über verschiedene Zeitpunkte durchgeführt werden. Fraglich ist auch, ob es sich nach diesen langen Zeiträumen tatsächlich um ein Aufnahmexperiment handelt, oder ob die Bedingungen nicht eher einem Effluxexperiment mit vorheriger Substratbeladung gleichen. Eine weitere Möglichkeit wäre es, Lysosomen aus den SLC10A4-HEK293-Zellen zu isolieren, die VNUT-Aktivität durch die spezifischen Inhibitoren DIDS und *Evans Blau* zu hemmen sowie ATP nach Inkubation über eine Biolumineszenzmessung zu detektieren. Auch eine modifizierte Version des Experimentes, mit welchem der VNUT in PC12-Zellen dargestellt wurde, könnte weitere Hinweise auf die Funktion von SLC10A4 geben (Sawada et al. 2008). Dafür müsste die endogene Expression von rSlc10a4 in PC12-Zellen durch siRNA-Transfektion supprimiert und die Freisetzung von ATP nach einer Inkubationszeit (30 min), ausgelöst durch die depolarisierende Zugabe von Kaliumchlorid, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gemessen werden.

5.10 Die Rückkreuzung der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus - Zeitverlust oder Notwendigkeit?

In dieser Arbeit wurden die Voraussetzungen für alle folgenden Studien an der *Slc10a4*-Knockout-Maus geschaffen. Die gelungene Deletion des *Slc10a4*-Gens wurde in der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus durch Analyse der genomischen DNA, der RNA und der Proteinexpression überprüft und eine Genotypisierung etabliert. Die B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus ist lebensfähig, fertil und zeigt keine anatomischen Anomalitäten, welche weitere phänotypische Analysen negativ beeinflussen könnte. Da SLC10A4/rSlc10a4 ein neuronales Protein ist, das im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird (Geyer et al. 2006, 2008, Burger et al. 2011), ist eine Auswirkung auf das Verhalten möglich, wodurch dann genetische Mechanismen enthüllt werden können, die einem physiologischen Verhalten zugrunde liegen. Der genetische Hintergrund der B6.129S5-Slc10a4^{tm1Lex} Knockout-Maus wird als gemischt bezeichnet, da für die Generierung embryonale Stammzellen des Mausstammes 129SvEvBrd und Blastozysten des Mausstammes C57BL/6 verwendet wurden. Diese Maus ist für phänotypische Verhaltensstudien als sehr kritisch anzusehen, da beide Mausstämme ganz unterschiedliche

Verhaltensweisen zeigen können. Während einige der *129SvEvBrd* Unterstämme ein unvollständiges oder fehlendes *Corpus callosum* besitzen und eher schlechte Leistungen in Lern- und Gedächtnisaufgaben zeigen, demonstrieren *C57BL/6* Mäuse eine unübliche Neigung dazu, sich selbst Drogen wie Kokain und Ethanol zu verabreichen (Crawley & Paylor 1997). Die beste Wahl, um den Einfluss einer Deletion auf das Lernverhalten zu analysieren, sind die Mäuse aus dem *C57BL/6* Stamm, da diese ein moderates Lernverhalten besitzen, sodass eine Verbesserung, sowie eine Verschlechterung detektiert werden kann (Crawley et al. 1997). Außerdem gehört der *C57BL/6* Stamm zu den eher aktiven Inzuchtstämmen, was sich im *Open-Field-Test* in einer erhöhten Lokomotion äußert (Crawley et al. 1997), während die *129SvEvBrd* Stämme eher als passiv gelten, was wiederum zu Problemen im *Open-Field-Test* und auf dem *Rotarod* führen kann (Gerlai 1996). Wenn man jedoch die induzierte Aktivität durch die Applikation von Kokain vergleicht, sind die Reaktionen beider Mausstämmen fast identisch. Jedoch zeigt der eher hypoaktive *129SvEvBrd* Stamm auch auf die Applikation von Kochsalzlösung eine drei- bis vierfach erhöhte lokomotorische Aktivität (Crawley et al. 1997). Interessanterweise haben sehr viele Studien an Mäusen, die aus den embryonalen Stammzellen der *129SvEvBrd* und den Blastozysten eines weiteren Stammes generiert wurden, gezeigt, dass die Chimären die gleichen Verhaltensdefekte wie der *129SvEvBrd* Mausstamm zeigen. Es ist deshalb möglich, dass die phänotypischen Auffälligkeiten, die zwischen Wildtyp und Chimäre beobachtet wurden, aufgrund der genetischen Unterschiede der für die Generierung verwendeten Inzuchtstämmen beruhen und nicht auf der genetischen Mutation (Gerlai 1996). Denn Hybridmäuse aus *129SvEvBrd* und *C57BL/6*, welche die Deletion tragen, unterscheiden sich von ihrem Wildtyp nicht nur am Locus des Zielgens, sondern auch an anderen Loci. Auch bei Geschwistern aus einem Wurf kann sich das Rekombinationsmuster unterscheiden, was bedeutet, dass nicht einmal die Wurfgeschwister eine gute Kontrollgruppe für die mutierten Mäuse darstellen und deren Verwendung zu falsch positiven Ergebnissen führen können (Gerlai 1996). Die beste Vorgehensweise ist deshalb - vor allem bei einem neuronalen Protein mit unbekannter Funktion, dessen Deletion in der phänotypischen Analyse eventuell nur zu sehr feinen Abweichungen vom physiologischen Verhalten des Wildtyps führt - das Herstellen eines kongenen Stammes durch konsequente Rückkreuzung auf einen Mausstamm. Der genetische Hintergrund sollte genauso sorgsam kontrolliert werden wie jede andere Variable eines Experimentes (Crawley et al. 1997). Die Rückkreuzung ist damit eine Möglichkeit, den Effekt eines einzelnen Gens zu bewerten und den des genetischen Hintergrundes weitestgehend zu eliminieren (Yoshiki & Moriwaki 2006). Abschließend lässt sich sagen, dass die Rückkreuzung zeitaufwendig und teuer, aber definitiv eine Obligation ist. Die Rückkreuzung der B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus ist bis zum Generationsäquivalent NE8 (Tab. 4.5) fortgeschritten. Damit steht uns nun für alle weiteren

Versuche eine B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus zur Verfügung, welche einen kongenen C57BL/6 Hintergrund besitzt. Deshalb werden diese in der offiziellen Nomenklatur nun nicht mehr als B6;129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus bezeichnet, sondern als B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Maus. Zwischen der Abkürzung des Rezipientenstammes C57BL/6 (B6) und der des Donorstammes 129S5SvEvBrd (129S5) der embryonalen Stammzelle wird das Semikolon, nach einer erfolgreichen Rückkreuzung, durch einen Punkt ersetzt.

5.11 Neue Erkenntnisse über die *Slc10a4*-Knockout-Maus

Gegen Ende der hier vorliegenden Dissertation wurden einige neue Erkenntnisse über die *Slc10a4*-Knockout-Maus publiziert (Zelano et al. 2013, Larhammar et al. 2014, Patra et al. 2014). Der Rückkreuzungsstatus ist erst in der zuletzt veröffentlichten Publikation angegeben. Da sich die verwendeten Mäuse erst in der dritten Generation befinden, gehen wir davon aus, dass die vorherigen Studien wahrscheinlich auf einem gemischten Hintergrund entstanden sind. Dies ist eigentlich unüblich, da eine Rückkreuzung bis zur mindestens siebten Generation vor der Durchführung von Phänotypisierungen empfohlen wird. Die *Slc10a4*-Knockout-Maus entwickelt sich nach Angaben in diesen Arbeiten, wie auch in der eigenen Rückkreuzung ohne offensichtliche morphologische Auffälligkeiten. In der Phänotypisierung waren keine Unterschiede zwischen der *Slc10a4*-Knockout-Maus und dem korrespondierenden Wildtyp zu sehen. Es wurde lediglich eine leichte, aber signifikante Hypoaktivität in den Aktivitätskäfigen festgestellt (Larhammar et al. 2014). Bei der Interpretation dieser Daten ist zu beachten, dass die Verwendung unterschiedlicher Mausstämme mit unterschiedlichen basalen Aktivitätsleveln die Auswertung erschweren, was z.B. bereits bei *Dat*-Knockout-Mäusen gezeigt wurde. Denn die C57BL/6J und die 129SvEvBrd Mauslinien unterscheiden sich drei- bis vierfach in ihrer Aktivität in einer neuen Umgebung, während der Stress durch eine NaCl-Injektion eine sehr viel größere Aktivität in den 129SvEvBrd als in den C57BL/6J auslöst. Gerade bei der Interpretation sehr feiner, aber wichtiger Unterschiede in der Aktivität, müssen die Effekte des Hintergrundes demnach beachtet werden (Uhl et al. 1996).

Die erste Studie befasste sich mit dem potentiellen Einfluss von *mSlc10a4* im zentralen cholinergen System (Zelano et al. 2013). Die *in vitro* Studien an Gewebepräparationen aus dem *Hippocampus* zeigten bei der *Slc10a4*-Knockout-Maus spontane γ -Oszillationen im Gegensatz zur Wildtypmaus. Zusätzlich zeigte sich nach cholinерger Stimulation durch die Gabe von Carbachol, einem muskarinergen Agonisten, welcher verwendet wird, um eine epileptiforme Aktivität auszulösen, eine verminderte Reizschwelle (Zelano et al. 2013). Des Weiteren wurde mittels Elektroenzephalografie *in vivo* festgestellt, dass die *Slc10a4*-

Knockout-Maus bereits *pre applicationem* eine frequente *Spike-wave-Aktivität* besitzt und auf die Applikation des cholinergen Agonisten Pilocarpin, nicht aber auf die des glutamatergen Agonisten Kainat, schneller mit der Entwicklung eines *Status epilepticus* reagiert, als die Wildtypmaus (Zelano et al. 2013). Die Absenz von *mSlc10a4* führt im Mausmodell zu einer selektiv cholinergen Hypersensitivität und dadurch zu einer erhöhten Vulnerabilität für Epilepsie (Zelano et al. 2013). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie an *Vacht*-Knockdown-Mäusen erzielt, deren Phänotyp sich durch eine initiale periphere und zentrale cholinerge Hypofunktion auszeichnet, welcher ebenfalls empfindlicher auf die *Status epilepticus* induzierende Pilocarpin-Applikation reagiert. Dieser Effekt wurde durch eine vermutliche Hochregulierung oder Überaktivierung der M₁-Rezeptoren erklärt, welche mit einer erhöhten Sensitivität für den jeweiligen Agonisten assoziiert werden (Guidine et al. 2008). Jedoch war die mRNA-Expression der untersuchten präsynaptischen Transporter und cholinergen Rezeptoren (ausschließlich M₃) in der *Slc10a4*-Knockout-Maus nicht verändert. Somit gab es keinen weiteren Hinweis auf den Ursprung der cholinergen Sensitivität (Zelano et al. 2013). Nicht unbeachtet bleiben darf die Tatsache, dass in dieser Studie keine Angaben zum Rückkreuzungsstatus gemacht wurden und es bekannt ist, dass die Induktion eines *Status epilepticus* durch die Applikation von Pilocarpin in unterschiedlichen Mausstämmen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Shibley & Smith 2002, Chen et al. 2005). Kritisch zu sehen ist auch, dass die Gruppengröße des Pilocarpin-induzierten *Status epilepticus* mit nur sechs Tieren per Genotyp zu klein angesetzt wurde (Zelano et al. 2013). In einer weiteren Studie wurde postuliert, dass *mSlc10a4* die Dopaminhomöostase moduliert (Larhammar et al. 2014). Die synaptischen Vesikel der *Slc10a4*-Knockout-Maus zeigten in dieser Studie eine verminderte Aufnahmeeffizienz für Dopamin, die Gehirnesikel einer *Slc10a4*-überexprimierenden Maus zeigten hingegen eine ansteigende Ansäuerung des pH-Wertes und eine vermehrte Akkumulation von Dopamin im Vergleich zu Kontrolltieren. Dies führte zu der Aussage, dass *mSlc10a4* die vesikuläre Aufnahmeeffizienz von Dopamin steigert. In den *in vitro* Aufnahmeversuchen mit radioaktiv-markiertem Dopamin konnte in dieser Arbeit jedoch ein direkter Transport durch SLC10A4 nicht signifikant dargestellt werden (Abb. 4.9 und Abb. 4.10). *In vivo* führt das Fehlen von *mSlc10a4* zu einer verlangsamten Dopamineliminierungsrate und daraus folgenden Akkumulation im Extrazellularraum. Die Gewebekonzentrationen von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin (*Putamen*, *Nucleus accumbens*) und Cholin (*Striatum*) waren reduziert, die AcetylcholinKonzentration war unverändert und die Dopaminumsatzrate war signifikant erhöht. Die *Slc10a4*-Knockout-Maus reagierte auf die Applikation der Psychostimulanzien Amphetamin und Tranylcypromin sowie dem D₂-Rezeptoragonist Quinpirol in den Verhaltensstudien hypersensitiv, was sich in einer stimulierten, motorischen Hyperaktivität äußerte (Larhammar et al. 2014). Aufgrund der Expression von *mSlc10a4* ist der Vergleich

mit *Vmat2*-Knockout-Mäusen naheliegend. Diese versterben bereits einige Tage nach der Geburt, da sie die Fähigkeit, Monoamine zu speichern und freizusetzen, verloren haben (Wang et al. 1997). Durch eine reduzierte Expression von *mVmat2* sinkt auch die Menge des neuronal freigesetzten Dopamins bei heterozygoten Knockout-Mäusen (Fon et al. 1997). Die extrazelluläre Dopaminkonzentration ist um ca. 40 % reduziert, die intraneuronale Gewebekonzentration um ca. 25 %, während die Konzentration des Metaboliten DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylacetat) ansteigt und die KCl-stimulierte exozytotische Freisetzung von Dopamin im Vergleich zur Wildtypmaus vierfach verringert ist, was sich phänotypisch in einer Hypoaktivität äußert (Fon et al. 1997, Wang et al. 1997). Die durch Kaliumchlorid evozierte Dopaminfreisetzung war in der *Slc10a4*-Knockout-Maus nicht verändert, wodurch fraglich ist, ob *mSlc10a4* die Monoaminhomöostase auf der Ebene der vesikulären Aufnahme überhaupt modifiziert. Wenn *mSlc10a4*, wie postuliert, die Dopaminaufnahmeeffizienz steigert, würde man erwarten, dass sich der Verlust von *mSlc10a4* in der Maus in einer verminderten Freisetzung von Dopamin nach KCl-Stimulation äußert. Auffällig war jedoch, dass Dopamin bei den *Slc10a4*-Knockout-Mäusen nach der Stimulation länger im Extrazellularraum verweilt, was eigentlich mehr für eine verminderte Aufnahme über die Plasmamembran, möglicherweise über eine Herabregulierung der präsynaptischen DAT-Aktivität, spricht. Diese widerspricht dann jedoch dem leicht hypoaktiven Phänotyp. Im Vergleich dazu ist der Verlust von DAT in der Maus durch hohe extrazelluläre Dopaminlevel (fünffach erhöht zum Wildtyp), verminderte intrazelluläre Speicherung, eine um 75 % verminderte exozytotische Freisetzung, eine stark verminderte Dopamin-Clearance-Rate und eine daraus resultierende spontane Hyperaktivität, welche durch die Psychostimulanzien Kokain und Amphetamin paradoxerweise gehemmt wird, gekennzeichnet (Giros et al. 1996, Jones et al. 1998, Gainetdinov et al. 1999). Verminderte Monoaminlevel wurden auch im Gehirn der *mSert*- und *mNet*-defizienten Mäuse gefunden (Gainetdinov & Caron 2003) und in einer etwas geringer ausgeprägten Form in der *Oct2*- und *Oct3*-Knockout-Maus (Couroussé & Gautron 2014). Allerdings wurde für *Dat*- und *Sert*-Knockout-Mäuse gezeigt, dass der genetische Hintergrund, auf welchen die Rückkreuzung erfolgt, einen dramatischen Effekt auf die Ausprägung des Phänotyps haben kann (Holmes, Lit, et al. 2003, Morice et al. 2004). Heterozygote *Vmat2*-Knockout-Mäuse reagieren auf die Applikation der indirekten Agonisten Kokain und Amphetamin mit einer im Vergleich zu den Wildtypmäusen erhöhten lokomotorischen Aktivität, welche durch eine erhöhte Sensitivität bei unveränderter mRNA-Expression der postsynaptischen D₁/D₂-Rezeptoren erklärt wird (Wang et al. 1997). Dieser genotypische Unterschied ist bei den *Slc10a4*-Knockout-Mäusen für Kokain nicht detektierbar, sondern nur für Amphetamin (Larhammar et al. 2014). Wenn bei der *Slc10a4*-Knockout-Maus eine erhöhte Sensitivität der D₁/D₂-Rezeptoren vorliegen würde, so würde man erwarten, dass beide indirekten Dopaminagonisten (Kokain und Amphetamin) eine

erhöhte lokomotorische Aktivität bewirken, da beide Wirkstoffe zu einer erhöhten Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt führen. Außerdem wird eine erhöhte Sensitivität der Rezeptoren vor allem bei einer langfristigen Entfernung des Neurotransmitters, wie es z. B. bei der *Th*-Knockout-Maus der Fall ist, gesehen und ist eine Adaptation an die insuffiziente Dopaminfreisetzung (Kim et al. 2000). Jedoch konnte durch eine Expressionsanalyse von *mVglut2*, *mVaat* (*vesicular inhibitory amino acid transporter*), *mChat*, *mVacht* und *mDat* mittels *in-situ* Hybridisierung (Zelano et al. 2013) und von *TH* sowie *D₁*- und *D₂*-Rezeptor mittels quantitativer Real-Time PCR (Larhammar et al. 2014), welche in beiden Genotypen vergleichend durchgeführt wurde, eine kompensatorische Gegenregulation dieser Gene während der Entwicklung ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zu der modulatorischen Funktion der zentralen cholinergen Neurotransmission (Zelano et al. 2013) soll *mSlc10a4* auch eine regulatorische Rolle in den peripheren cholinergen Synapsen - den motorischen Endplatten besitzen (Patra et al. 2014). ACh hat einen großen Einfluss auf die Entwicklung und Reifung prä - und postsynaptischer Aspekte der neuromuskulären Endplatte *in utero* (Sanes & Lichtman 1999). Immunhistochemische Untersuchungen an der neuromuskulären Endplatte der *Slc10a4*-Knockout-Maus zeigten eine veränderte Synaptogenese mit einer fragmentierten Struktur, einer erhöhten Anzahl an weniger verzweigten, isolierten ACh-Rezeptor-Clustern, aber keine Veränderungen der präsynaptischen, axonalen Aufzweigungen (Patra et al. 2014). Die *Vacht*-Knockout-Maus zeigt aufgrund einer massiven Verminderung des cholinergen Einflusses während der Entwicklung profunde Effekte auf das axonale Wachstum, die Anzahl der Nervenendigungen und die Morphologie der Synapse und der Muskulatur (de Castro, De Jaeger, et al. 2009). Dies ähnelt dem Phänotyp der *Chat*-Knockout-Maus, welche kein ACh synthetisieren kann und nach der Geburt verstirbt (Misgeld et al. 2002), und dem der *Cht1*-Knockout-Maus (Ferguson et al. 2004). Trotz der strukturellen Defekte waren die motorischen Fähigkeiten der *Slc10a4*-Knockout-Maus im *Grip-Strength*- und *Hanging-Wire-Test* nicht verändert. Die Expression von *mVacht* wurde in der *Vacht*-Knockdown-Maus um 70 % reduziert (*Vacht*-KD^{HOM}) und führte zu einer Beeinflussung der Neurotransmission an der neuromuskulären Endplatte. Der Phänotyp dieser Mäuse zeigte eine Myasthenie und bedeutende Funktionsdefizite in den oben genannten neuromuskulären Tests (Prado et al. 2006). Bei der heterozygoten *Vacht*-Knockout-Maus sind keine negativen Effekte auf die Muskelfunktion mehr zu sehen (de Castro, Pereira, et al. 2009). In elektrophysiologischen Untersuchungen der neuromuskulären Endplatte der *Slc10a4*-Knockout-Maus war die Amplitude des Miniatur-Endplattenpotentials (MEPPs), also die postsynaptische Reaktion auf die spontane, von einem Aktionspotential unabhängige Freisetzung eines einzigen Quantums, vermindert, die Frequenz jedoch unverändert (Patra et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei einer um 50 % reduzierten Expression von *mVacht* (*Vacht*-KD^{HET}) vorgefunden, während bei der

Vacht-KD^{HOM} Maus die Frequenz der MEPP's und das Endplattenpotential reduziert sind (Prado et al. 2006, Lima et al. 2010). Paradoxerweise ist die Amplitude eines ausgelösten Endplattenpotentials bei der *Slc10a4*-Knockout-Maus erhöht und eine wiederholte Stimulation im hohen Frequenzbereich führte zu einer vermehrten synaptischen Depression (Patra et al. 2014). Es wird vermutet, dass dies aus einer post-synaptischen Sensibilisierung, durch eine hochregulierte Expression cholinergischer Rezeptoruntereinheiten in der Muskulatur, sowie einer präsynaptisch erhöhten Anzahl der sofort freisetzbaren Vesikel resultiert. Die Gewebekonzentrationen von Acetylcholin sind im *Striatum* der *Vacht*-Knockdown-Maus, wahrscheinlich auch aufgrund einer erhöhten *mChat1*- und *mChat*-Expression (de Castro, De Jaeger, et al. 2009), erhöht (Prado et al. 2006) und bei der *Slc10a4*-Knockout-Maus unverändert (Larhammar et al. 2014). Fraglich ist dann, warum *mSlc10a4* nicht auch zentral zu einer verminderten Füllung mit Acetylcholin führt und zu erhöhten intrazellulären ACh-Konzentrationen. Erst kürzlich wurden Mauslinien generiert, in welchen die *mVacht*-Expression im Gehirn in unterschiedlichem Ausmaß reduziert und der periphere Phänotyp begrenzt wurde. Eine mehr als 50 %-ige Reduktion der *mVacht*-Expression im Gehirn führt phänotypisch zu einer Hyperaktivität, was einen Hinweis darauf gibt, dass ACh normalerweise für die Regulation neuronaler Schaltkreise, welche die Lokomotion kontrollieren, benötigt wird (Martins-Silva et al. 2011, Martyn et al. 2012). Die *Slc10a4*-Knockout-Maus war jedoch leicht hypoaktiv (Larhammar et al. 2014). Die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte wird jedoch nicht nur durch die cholinerge Neurotransmission, sondern auch durch ATP, als ein Kotransmitter von ACh, über die purinerge Signaltransduktion an den P2X₂-Rezeptoren beeinflusst (Ryten et al. 2007). Interessant war in diesem Zusammenhang, dass bei der *Slc10a4*-Knockout-Maus die mRNA-Expression des präsynaptischen Adenosinrezeptors A2A um 40 % herunterreguliert wurde (Patra et al. 2014). Die Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe wie folgt interpretiert: Der Verlust von *mSlc10a4* führt zu einer verminderten Füllung der synaptischen Vesikel mit Acetylcholin (Patra et al. 2014). Wenn *mSlc10a4* diese physiologische Bedeutung besitzt, so ist es fraglich, warum der Phänotyp der *Slc10a4*-Knockout-Maus diesen nicht deutlicher widerspiegelt. Denn die *Vacht*-Knockout-Maus ist nicht lebensfähig aufgrund einer defekten neuromuskulären Funktion (de Castro, De Jaeger, et al. 2009) und die *Vacht*-Knockdown-Maus (*VACHT*-KD^{HOM}) ist myasthenisch (Prado et al. 2006). Die *Slc10a4*-Knockout-Maus ist von den bisherigen Versuchen ausgehend mit der heterozygoten *Vacht*-Knockout-Maus vergleichbar, da diese Defizite in der Wiedererkennung von Sozialpartnern und Objekten, ausgelöst durch eine verminderte ACh-Freisetzung im Gehirn, besitzt (Prado et al. 2006), wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Defizite auch bei der *Slc10a4*-Knockout-Maus bestehen. Die vesikuläre Füllung mit ACh wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Acetylcholinsynthese ist die Aufnahme von

Cholin über den CHT1 (Ribeiro et al. 2006). Eine verminderte Aufnahme von Cholin würde zu einer verminderten intrazellulären ACh-Konzentration und folglich zu einer verminderten vesikulären Anreicherung führen. Erst kürzlich wurde die Expression von rOct2 in synaptischen Vesikeln cholinergischer Neurone und auch in der neuromuskulären Endplatte detektiert. Dieser transportiert Na^+ - und Cl^- -unabhängig Cholin und wird in Verbindung gebracht mit dem Recycling von ACh (Nakata et al. 2013). Beide Transporter können folglich für eine verminderte intrazelluläre ACh-Synthese verantwortlich sein. Der VACHT transportiert ACh in die Vesikel im Austausch gegen zwei luminale Protonen und ist besonders abhängig vom Protonengradienten (ΔpH), welcher durch die vakuoläre H^+ -ATPase generiert wird (Prado et al. 2002). Die vermehrte Aufnahme von Protonen in das Vesikellumen führt zu einem sauren pH-Wert und gleichzeitig zu einer erhöhten positiven Spannung, die ohne einen neutralisierenden Einstrom aus Anionen (z.B. Chlorid) die Aktivität der vakuolären H^+ -ATPase limitiert. Es wird angenommen, dass das Anion Chlorid hauptsächlich an der Ansäuerung der Vesikel beteiligt ist (Hnasko & Edwards 2012). Verantwortlich für den Transport von Chlorid sind Chloridkanäle, welche teilweise vermutlich auch als Cl^-/H^+ -Antiporter agieren (Abb. 5.5) (Carraro-Lacroix et al. 2009).

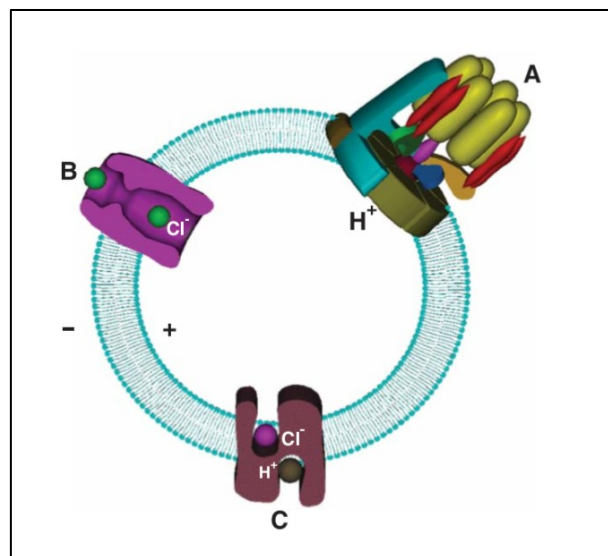


Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Regulation der vakuolären H^+ -ATPase durch Cl^- -Ionen

Die vakuolären H^+ -ATPase (A) generiert über den einwärtsgerichteten Transport von H^+ -Ionen einen Protonengradienten. Über Chloridkanäle (B) oder Cl^-/H^+ -Antiporter (C) wird ein neutralisierender Cl^- -Einstrom vermittelt (aus L.R. Carraro-Lacroix et al. 2009).

Die Deletion des in synaptischen Vesikeln lokalisierten Chloridkanals 3 führt in der Maus funktionell zu einem erhöhten intraendosomal pH-Wert und phänotypisch zu Entwicklungsstörungen, erhöhter Mortalität, Erblindung, Defiziten in der motorischen Koordination und spontaner Hyperaktivität (Yoshikawa et al. 2002). An der neuromuskulären Endplatte eines Frosches wurde gezeigt, dass die Inhibition von Chloridkanälen die Aufnahme von ACh in synaptische Vesikel reduziert (Van der Kloot 2003). Zusätzlich zu

seiner Rolle als Neurotransmitter, fördert das anionische ATP die Speicherung der kationischen monoaminergen Neurotransmitter (Bankston & Guidotti 1996). Eine verminderte vesikuläre Aufnahme von ATP würde folglich zu einer verminderten Aufnahme und Freisetzung von ACh führen und könnte somit die geringere MEPP-Amplitude der *Slc10a4*-Knockout-Maus erklären. Auch die vesikulär freigesetzte ATP-Konzentration wäre dann im synaptischen Spalt verringert. ATP und auch das Abbauprodukt Adenosin selbst beeinflussen die cholinerge Neurotransmission an der neuromuskulären Endplatte auf unterschiedliche Weise. Während ATP zu einer Reduktion der Amplitude eines Endplattenpotentials führt (Giniatullin & Sokolova 1998), so kann Adenosin über den Adenosinrezeptor die Freisetzung von ACh und somit das Ausmaß der synaptischen Depression reduzieren (Redman & Silinsky 1994). Dementsprechend würden ein erhöhtes Endplattenpotential und eine verstärkte synaptische Depression für eine reduzierte synaptische Freisetzung von ATP sprechen (Patra et al. 2014).

6 Zusammenfassung

SLC10A4 wurde im Jahre 2004 als ein neues Mitglied der SLC10-Familie identifiziert. NTCP und ASBT sind die Gründungsmitglieder der SLC10-Familie und verantwortlich für die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der GS. SLC10A4 besitzt die höchste Sequenzidentität (29,7 %) zu dem Gallensäuretransporter der Leber, NTCP. Außerdem weist SLC10A4 eine zu NTCP, ASBT und SOAT identische Membrantopologie auf, mit sieben oder neun Transmembrandomänen und einem extrazellulären N-Terminus und zytoplasmatischen C-Terminus. Jedoch handelt es sich bei SLC10A4 um ein neuronales Protein, dessen höchste Expression im Gehirn vorliegt. Auf subzellulärer Ebene wird SLC10A4 in synaptischen Vesikeln cholinерger und monoaminerger Neurone des zentralen und peripheren Nervensystems und in Mastzellen exprimiert. Das Ziel dieser Arbeit war es die bisher unbekannte Funktion von SLC10A4 zu untersuchen.

Die Zugehörigkeit zu einer Transporterfamilie und die beschriebene Lokalisation führten zu der Hypothese, dass es sich bei SLC10A4 um einen Transporter für Neurotransmitter oder deren Intermediate handeln könnte. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit, die plasmamembranständigen Neurotransmittertransporter DAT, CHT1 und SERT und die vesikulären Neurotransmittertransporter VACHT und VMAT2, als Positivkontrollen für ein funktionierendes Expressionssystem, kloniert. Nach transienter oder stabiler Transfektion in HEK293-Zellen und in *Xenopus laevis* Oozyten wurden Transportmessungen mit radioaktiv-markierten Kandidatensubstraten durchgeführt. Die Gallensäure TC und die Steroidsulfate DHEAS, PREGS und E₁S gehören in das Substratspektrum von NTCP, jedoch nicht in das von SLC10A4. Die Neurotransmittertransporter DAT, CHT1 und SERT zeigten eine Na⁺-abhängige und Inhibitor-sensitive Aufnahme ihrer spezifischen Substrate und auch VMAT2 konnte in den nicht-neuronalen HEK293-Zellen charakterisiert werden. Jedoch konnte für SLC10A4 kein signifikant reproduzierbarer Transport für Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Histamin, Cholin, Acetat, Acetylcholin, Glutamat, Aspartat und GABA gemessen werden. Die kürzlich publizierten Daten über eine Protease-aktivierbare Transportaktivität von SLC10A4 für die GS LC und TC konnte in den SLC10A4-HEK293-Zellen nicht bestätigt werden. Überraschenderweise wurde nach langen Inkubationszeiten eine verminderte ATP-Akkumulation in SLC10A4-HEK293-Zellen festgestellt. Dieses Ergebnis bedarf einer weiteren Aufklärung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} Knockout-Mausmodell etabliert und erfolgreich auf den C57BL/6 Inzuchtstamm rückgekreuzt, um Hinweise auf die physiologische Rolle von SLC10A4 zu erhalten. Die Deletion des *mSlc10a4*-Gens wurde auf DNA-, RNA- und Proteinebene bestätigt und das Knockout-Mausmodell steht jetzt für phänotypische Untersuchungen zur Verfügung.

7 SUMMARY

SLC10A4 was identified in 2004 as a novel member of the solute carrier family SLC10. NTCP and ASBT are the founding members of this carrier family and are responsible for the maintenance of the enterohepatic circulation of bile acids. SLC10A4 has the highest sequence identity (29.7 %) with the bile acid transporter of the liver, NTCP. In addition, SLC10A4 exhibits an identical membrane topology to NTCP, ASBT and SOAT with seven or nine transmembrane domains and an extracellular N -terminus and a cytoplasmic C -terminus. However, SLC10A4 is a neuronal protein whose highest expression is present in the brain. At the subcellular level SLC10A4 is expressed in synaptic vesicles of cholinergic and monoaminergic neurons of the central and peripheral nervous system and in mast cells. The aim of the present study was to investigate the so far unknown function of SLC10A4.

The affiliation to a transporter family and the localization described above led to the hypothesis that SLC10A4 might be a transporter for neurotransmitters or for their intermediates. Therefore, in the context of this work the plasma membrane-associated neurotransmitter transporter DAT, SERT and CHT1 and the vesicular neurotransmitter transporter VACHT and VMAT2 were additionally cloned and used as positive controls for an efficient expression system. After transient or stable transfection in HEK293 cells and in *Xenopus laevis* oocytes transport measurements were performed with radioactively labeled candidate substrates. The bile acid TC and the steroid sulfates DHEAS, PREGS and E₁S belong to the substrate spectrum of NTCP, but not to that of SLC10A4. The neurotransmitter transporter DAT, SERT and CHT1 showed a Na⁺-dependent and inhibitor-sensitive uptake of their specific substrates and also VMAT2 was characterized in non-neuronal HEK293 cells. However, no significant reproducible transport of dopamine, serotonin, norepinephrine, histamine, choline, acetic acid, acetylcholine, glutamate, aspartate and GABA was detectable for SLC10A4. The recently published data for SLC10A4 to be a protease-activated transporter for the bile acids LC and TC was not confirmed in the SLC10A4-HEK293 cells. Surprisingly, a reduced ATP accumulation in SLC10A4-HEK293 cells was noted after long incubation times. This effect requires further investigation. In this work a B6.129S5-*Slc10a4*^{tm1Lex} knockout mouse model was established and successfully backcrossed to the C57BL/6 inbred strain to obtain evidence on the physiological role of SLC10A4. The deletion of the *mSlc10a4* gene was confirmed on DNA, RNA and protein level. Now, this mouse model is available for phenotypic analysis.

8 Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences* 32: 19–29.

Abe T, Kanemitsu Y, Nakasone M, Kawahata I, Yamakuni T, Nakajima A et al. (2013) SLC10A4 is a protease-activated transporter that transports bile acids. *Journal of Biochemistry*: 1–9.

Alber J, Jiang L, Geyer J (2013) CaRch1p does not functionally interact with the high-affinity Ca(2+) influx system (HACS) of *Candida albicans*. *Yeast* 30: 449–457.

Alcalay M, Toniolo D (1988) CpG islands of the X chromosome are gene associated. *Nucleic Acids Research* 16: 9527–9543.

Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, Han HP, Rand JB (1993) The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 261: 617–619.

Allen TGJ, Abogadie FC, Brown DA (2006) Simultaneous release of glutamate and acetylcholine from single magnocellular “cholinergic” basal forebrain neurons. *The Journal of Neuroscience* 26: 1588–1595.

Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinizz JL, Robertson WE, Lasater J, Caligiuri A, Tretjak Z, LeSage GD (1997) Functional expression of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 113: 1734–1740.

Alrefai WA, Gill RK (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharmaceutical Research* 24: 1803–1823.

Alter SP, Lenzi GM, Bernstein AI, Miller GW (2013) Vesicular integrity in Parkinson's disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 13: 362.

Alvarez FJ, Benito-Gonzalez A, Siembab VC (2013) Principles of interneuron development learned from Renshaw cells and the motoneuron recurrent inhibitory circuit. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1279: 22–31.

Amenta F, Bronzetti E, Cantalamessa F, El-Assouad D, Felici L, Ricci A, Tayebati SK (2001) Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology* 117: 133–142.

Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ (1994) Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *The American Journal of Physiology* 267: G637–643.

Ansorge MS, Zhou M, Lira A, Hen R, Gingrich JA (2004) Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306: 879–881.

Apparsundaram S, Ferguson SM, Blakely RD (2001) Molecular cloning and characterization of a murine hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochemical Society Transactions* 29: 711–716.

Apparsundaram S, Ferguson SM, George AL, Blakely RD (2000) Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 862–867.

- Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B (1997) Vesicular acetylcholine transporter (VACht) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *The Journal of Comparative Neurology* 378: 454–467.
- Bankston LA, Guidotti G (1996) Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 17132–171328.
- Baulieu EE (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23: 963–987.
- Bazalakova MH, Wright J, Schneble EJ, McDonald MP, Heilman CJ, Levey AI, Blakely RD (2007) Deficits in acetylcholine homeostasis, receptors and behaviors in choline transporter heterozygous mice. *Genes, Brain, and Behavior* 6: 411–424.
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews* 63: 182–217.
- Bengel D, Heils A, Petri S, Seemann M, Glatz K, Andrews A, Murphy DL, Lesch KP (1997) Gene structure and 5'-flanking regulatory region of the murine serotonin transporter. *Brain Research. Molecular Brain Research* 44: 286–292.
- Bengel D, Jöhren O, Andrews AM, Heils A, Mössner R, Sanvitto GL, Saavedra JM, Lesch KP, Murphy DL (1997) Cellular localization and expression of the serotonin transporter in mouse brain. *Brain Research* 778: 338–345.
- Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mössner R, Westphal H, Lesch KP (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Molecular Pharmacology* 53: 649–655.
- Bernstein AI, Stout KA, Miller GW (2014) The vesicular monoamine transporter 2: An underexplored pharmacological target. *Neurochemistry International* 73: 89–97.
- Bijsmans ITGW, Bouwmeester RAM, Geyer J, Faber KN, van de Graaf SFJ (2012) Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na⁺-dependent taurocholate co-transporting protein. *The Biochemical Journal* 441: 1007–1015.
- Blakely RD, Berson HE, Freneau RT, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC (1991) Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 354: 66–70.
- Blakely RD, Edwards RH (2012) Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: pii: a005595. DOI: 10.1101/cshperspect.a005595.
- Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ (1998) Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biological Psychiatry* 44: 169–178.
- Bliziotis M, McLoughlin S, Gunness M, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG (2000) Bone histomorphometric and biomechanical abnormalities in mice homozygous for deletion of the dopamine transporter gene. *Bone* 26: 15–19.
- Borges K (2013) Slc10A4 - what do we know about the function of this "secret ligand carrier" protein? *Experimental Neurology* 248: 258–261.

Bossé R, Fumagalli F, Jaber M, Giros B, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Missale C, Caron MG (1997) Anterior pituitary hypoplasia and dwarfism in mice lacking the dopamine transporter. *Neuron* 19: 127–138.

Boyer JL, Ng OC, Ananthanarayanan M, Hofmann AF, Schteingart CD, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1994) Expression and characterization of a functional rat liver Na⁺ bile acid cotransport system in COS-7 cells. *The American Journal of Physiology* 266: G382–387.

Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Dominguez B, Sugiura Y et al. (2003) Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *The Journal of Neuroscience* 23: 539–549.

Bravo DT, Kolmakova NG, Parsons SM (2004) Choline is transported by vesicular acetylcholine transporter. *Journal of Neurochemistry* 91: 766–768.

Brüss M, Wieland A, Bönisch H (1999) Molecular cloning and functional expression of the mouse dopamine transporter. *Journal of Neural Transmission* 106: 657–662.

Burger S, Döring B, Hardt M, Beuerlein K, Gerstberger R, Geyer J (2011) Co-expression studies of the orphan carrier protein Slc10a4 and the vesicular carriers VACHT and VMAT2 in the rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 193: 109–121.

Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews* 24: 509–581.

Burnstock G (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1: 239–248.

Burnstock G (2009) Purinergic signalling: past, present and future. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42: 3–8.

Burnstock G (2013) Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. *The Keio Journal of Medicine* 62: 63–73.

Busch W, Saier MH (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37: 287–337.

Cao Q, Zhao K, Zhong XZ, Zou Y, Yu H, Huang P, Xu T-L, Dong X-P (2014) SLC17A9 protein functions as a lysosomal ATP transporter and regulates cell viability. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 23189–23199.

Carraro-Lacroix LR, Lessa LMA, Fernandez R, Malnic G (2009) Physiological implications of the regulation of vacuolar H⁺-ATPase by chloride ions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42: 155–163.

Cattori V, Eckhardt U, Hagenbuch B (1999) Molecular cloning and functional characterization of two alternatively spliced Ntcp isoforms from mouse liver1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1445: 154–159.

Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, Blakely RD (1996) Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Brain Research. Molecular Brain Research* 43: 185–192.

Chaudhry FA, Edwards RH, Fonnum F (2008) Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48: 277–301.

- Chen J, Larionov S, Pitsch J, Hoerold N, Ullmann C, Elger CE, Schramm J, Becker AJ (2005) Expression analysis of metabotropic glutamate receptors I and III in mouse strains with different susceptibility to experimental temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters* 375: 192–197.
- Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD (2001) Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *The Journal of Neuroscience* 21: 6348–6361.
- Chen KH, Reese EA, Kim H-W, Rapoport SI, Rao JS (2011) Disturbed neurotransmitter transporter expression in Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimer's Disease* 26: 755–766.
- Chen N-H, Reith MEA, Quick MW (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 447: 519–531.
- Choi M-K, Shin HJ, Choi Y-L, Deng J-W, Shin J-G, Song I-S (2011) Differential effect of genetic variants of Na(+)-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) on the uptake of HMG-CoA reductase inhibitors. *Xenobiotica* 41: 24–34.
- Christie DM, Dawson PA, Thevananther S, Shneider BL (1996) Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *The American Journal of Physiology* 271: G377–385.
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI (1995) The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *The Journal of Neuroscience* 15: 1714–1723.
- Couroussé T, Gautron S (2014) Role of organic cation transporters (OCTs) in the brain. *Pharmacology & Therapeutics* 146C: 94–103.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *The American Journal of Physiology* 274: G157–169.
- Crawley JN (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Research* 835: 18–26.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N et al. (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 132: 107–124.
- Crawley JN, Paylor R (1997) A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Hormones and Behavior* 31: 197–211.
- Dal Bo G, Bérubé-Carrière N, Mendez JA, Leo D, Riad M, Descarries L, Lévesque D, Trudeau L-E (2008) Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156: 59–70.
- Darnaudéry M, Koehl M, Piazza P V, Le Moal M, Mayo W (2000) Pregnenolone sulfate increases hippocampal acetylcholine release and spatial recognition. *Brain Research* 852: 173–179.

- Darnaudéry M, Pallarès M, Piazza P-V, Le Moal M, Mayo W (2002) The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the medial septum nucleus increases hippocampal acetylcholine and spatial memory in rats. *Brain Research* 951: 237–242.
- Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N, Parks JS (2003) Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 33920–33927.
- Dawson PA, Lan T, Rao A (2009) Bile acid transporters. *Journal of Lipid Research* 50: 2340–2357.
- De Castro BM, De Jaeger X, Martins-Silva C, Lima RDF, Amaral E, Menezes C et al. (2009) The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. *Molecular and Cellular Biology* 29: 5238–5250.
- De Castro BM, Pereira GS, Magalhães V, Rossato JI, De Jaeger X, Martins-Silva C et al. (2009) Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes, Brain, and Behavior* 8: 23–35.
- De Graaf W, Häusler S, Heger M, van Ginhoven TM, van Cappellen G, Bennink RJ et al. (2011) Transporters involved in the hepatic uptake of (99m)Tc-mebrofenin and indocyanine green. *Journal of Hepatology* 54: 738–745.
- Díaz-Morán S, Palència M, Mont-Cardona C, Cañete T, Blázquez G, Martínez-Membrives E et al. (2013) Gene expression in hippocampus as a function of differential trait anxiety levels in genetically heterogeneous NIH-HS rats. *Behavioural Brain Research* 257: 129–139.
- Döring B, Lütteke T, Geyer J, Petzinger E (2012) The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Current Topics in Membranes* 70: 105–168.
- Dou Y, Wu H, Li H, Qin S, Wang Y, Li J et al. (2012) Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Research* 22: 1022–1033.
- Edwards RH (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55: 835–858.
- Efange SM., Garland E., Staley J., Khare A., Mash D. (1997) Vesicular Acetylcholine Transporter Density and Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging* 18: 407–413.
- Eiden LE, Weihe E (2011) VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1216: 86–98.
- Eisenhofer G, Aneman A, Friberg P, Hooper D, Fändriks L, Lonroth H, Hunyady B, Mezey E (1997) Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 3864–3871.
- English BA, Appalsamy M, Diedrich A, Ruggiero AM, Lund D, Wright J et al. (2010) Tachycardia, reduced vagal capacity, and age-dependent ventricular dysfunction arising from diminished expression of the presynaptic choline transporter. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 299: H799–810.
- Erickson JD, Eiden LE (1993) Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter. *Journal of Neurochemistry* 61: 2314–2317.
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10993–10997.

- Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E (1996) Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5166–5171.
- Erickson JD, Varoqui H, Schäfer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E et al. (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a “cholinergic” gene locus. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 21929–21932.
- Fagerlund MJ, Eriksson LI (2009) Current concepts in neuromuscular transmission. *British Journal of Anaesthesia* 103: 108–114.
- Fasano A, Bentivoglio AR (2009) Tetrabenazine. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 10: 2883–2896.
- Ferguson SM, Bazalakova M, Savchenko V, Tapia JC, Wright J, Blakely RD (2004) Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8762–8767.
- Ferguson SM, Blakely RD (2004) The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Molecular Interventions* 4: 22–37.
- Ferguson SM, Savchenko V, Apparsundaram S, Zwick M, Wright J, Heilman CJ, Yi H, Levey AI, Blakely RD (2003) Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *The Journal of Neuroscience* 23: 9697–9709.
- Fernandes CF, Godoy JR, Döring B, Cavalcanti MCO, Bergmann M, Petzinger E, Geyer J (2007) The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 26–32.
- Fields RD, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature Reviews. Neuroscience* 7: 423–436.
- Fietz D, Bakhaus K, Wapelhorst B, Grosser G, Günther S, Alber J et al. (2013) Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis—cellular localization, expression pattern and functional analysis. *PloS One* 8: e62638.
- Fon EA, Pothos EN, Sun B-C, Killeen N, Sulzer D, Edwards RH (1997) Vesicular Transport Regulates Monoamine Storage and Release but Is Not Essential for Amphetamine Action. *Neuron* 19: 1271–1283.
- Forgac M (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8: 917–929.
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254: 497–501.
- Frye CA (2001) The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Research. Brain Research Reviews* 37: 201–222.
- Fujino H, Saito T, Ogawa S-I, Kojima J (2005) Transporter-mediated influx and efflux mechanisms of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 1305–1311.

- Fukui M, Rodriguiz RM, Zhou J, Jiang SX, Phillips LE, Caron MG, Wetsel WC (2007) Vmat2 heterozygous mutant mice display a depressive-like phenotype. *The Journal of Neuroscience* 27: 10520–10529.
- Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43: 261–284.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283: 397–401.
- Geisler JC, Corbin KL, Li Q, Feranchak AP, Nunemaker CS, Li C (2013) Vesicular nucleotide transporter-mediated ATP release regulates insulin secretion. *Endocrinology* 154: 675–684.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends in Neurosciences* 19: 177–181.
- Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A (2006) Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 375–383.
- Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *The Journal of Biological Chemistry* 282: 19728–19741.
- Geyer J, Fernandes CF, Döring B, Burger S, Godoy JR, Rafalzik S, Hübschle T, Gerstberger R, Petzinger E (2008) Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152: 990–1005.
- Geyer J, Godoy JR, Petzinger E (2004) Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316: 300–306.
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E (2006) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372: 413–431.
- Gilmor ML, Nash NR, Roghani A, Edwards RH, Yi H, Hersch SM, Levey AI (1996) Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *The Journal of Neuroscience* 16: 2179–2190.
- Giniatullin RA, Sokolova EM (1998) ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors. *British Journal of Pharmacology* 124: 839–844.
- Giros B, Caron MG (1993) Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends in Pharmacological Sciences* 14: 43–49.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606–612.
- Giros B, el Mestikawy S, Bertrand L, Caron MG (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Letters* 295: 149–154.

- Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, Caron MG (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Molecular Pharmacology* 42: 383–390.
- Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, Pifl C, Caron MG (1994) Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 15985–15988.
- Godoy JR, Fernandes C, Döring B, Beuerlein K, Petzinger E, Geyer J (2007) Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *European Journal of Cell Biology* 86: 445–460.
- Goldberg AA, Beach A, Davies GF, Harkness TAA, Leblanc A, Titorenko VI (2011) Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells. *Oncotarget* 2: 761–782.
- Goldstein DS, Mezey E, Yamamoto T, Aneman A, Friberg P, Eisenhofer G (1995) Is there a third peripheral catecholaminergic system? Endogenous dopamine as an autocrine/paracrine substance derived from plasma DOPA and inactivated by conjugation. *Hypertension Research* 18 Suppl 1: S93–99.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *The Journal of Neuroscience* 22: 5442–5451.
- Greupink R, Dillen L, Monshouwer M, Huisman MT, Russel FGM (2011) Interaction of fluvastatin with the liver-specific Na⁺-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44: 487–496.
- Grosser G, Döring B, Ugele B, Geyer J, Kulling SE, Soukup ST (2014) Transport of the soy isoflavone daidzein and its conjugative metabolites by the carriers SOAT, NTCP, OAT4, and OATP2B1. *Archives of Toxicology*. DOI: 10.1007/s00204-014-1379-3.
- Grosser G, Fietz D, Günther S, Bakhaus K, Schweigmann H, Ugele B et al. (2013) Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter Soat (Slc10a6). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 138: 90–99.
- Guan C, Ye C, Yang X, Gao J (2010) A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis* 48: 73–85.
- Guidine PAM, Rezende GHS, Queiroz CMT, Mello LE, Prado VF, Prado MAM, Pereira GS, Moraes MFD (2008) Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice are more susceptible to pilocarpine induced status epilepticus. *Neuroscience Letters* 436: 201–204.
- Guillot TS, Miller GW (2009) Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Molecular Neurobiology* 39: 149–170.
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177–182.
- Haanes KA, Novak I (2010) ATP storage and uptake by isolated pancreatic zymogen granules. *The Biochemical Journal* 429: 303–311.
- Haenisch B, Bönisch H (2011) Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacology & Therapeutics* 129: 352–368.

- Hagenbuch B, Dawson P (2004) The sodium bile salt cotransport family SLC10. *European Journal of Physiology* 447: 566–570.
- Hagenbuch B, Lübbert H, Stieger B, Meier PJ (1990) Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 5357–5360.
- Hagenbuch B, Meier PJ (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *The Journal of Clinical Investigation* 93: 1326–1331.
- Hagenbuch B, Meier PJ (1996) Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Seminars in Liver Disease* 16: 129–136.
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 10629–10633.
- Han Y-H, Busler D, Hong Y, Tian Y, Chen C, Rodrigues AD (2010) Transporter studies with the 3-O-sulfate conjugate of 17 α -ethinylestradiol: assessment of human kidney drug transporters. *Drug Metabolism and Disposition* 38: 1064–1071.
- Hannah MJ, Schmidt AA, Huttner WB (1999) Synaptic vesicle biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 733–798.
- Harada Y, Hiasa M (2014) Immunological identification of vesicular nucleotide transporter in intestinal L cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 37: 1090–1095.
- Hata S, Wang P, Eftychiou N, Ananthanarayanan M, Batta A, Salen G, Pang KS, Wolkoff AW (2003) Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: implications for hepatic organic anion uptake. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 285: G829–839.
- Hediger MA, Cl  men  on B, Burrier RE, Bruford EA (2013) The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 95–107.
- Hediger MA, Romero MF, Peng J-B, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *European Journal of Physiology* 447: 465–468.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *The Journal of Neuroscience* 21: RC181.
- Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2014) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiological Reports* 2: pii: e12034. DOI: 10.14814/phy2.12034.
- Hnasko TS, Edwards RH (2006) Synaptic vesicles: half full or half empty? *Neuron* 51: 523–524.
- Hnasko TS, Edwards RH (2012) Neurotransmitter corelease: mechanism and physiological role. *Annual Review of Physiology* 74: 225–243.

- Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130: 1793–1806.
- Hoffman BJ (1994) Expression cloning of a serotonin transporter: a new way to study antidepressant drugs. *Pharmacopsychiatry* 27: 16–22.
- Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 254: 579–580.
- Holmes A, Lit Q, Murphy DL, Gold E, Crawley JN (2003) Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes, Brain, and Behavior* 2: 365–380.
- Holmes A, Murphy DL, Crawley JN (2002) Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology* 161: 160–167.
- Holmes A, Yang RJ, Lesch K-P, Crawley JN, Murphy DL (2003) Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 28: 2077–2088.
- Holmstrand EC, Lund D, Cherian AK, Wright J, Martin RF, Ennis EA, Stanwood GD, Sarter M, Blakely RD (2014) Transgenic overexpression of the presynaptic choline transporter elevates acetylcholine levels and augments motor endurance. *Neurochemistry International* 73: 217–228.
- Holton KL, Loder MK, Melikian HE (2005) Nonclassical, distinct endocytic signals dictate constitutive and PKC-regulated neurotransmitter transporter internalization. *Nature Neuroscience* 8: 881–888.
- Hua Y, Keep RF, Hoff JT, Xi G (2007) Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron. *Stroke* 38: 759–762.
- Huang P, Zou Y, Zhong XZ, Cao Q, Zhao K, Zhu MX, Murrell-Lagnado R, Dong X-P (2014) P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 17658–17667.
- Huh CYL, Danik M, Manseau F, Trudeau L-E, Williams S (2008) Chronic exposure to nerve growth factor increases acetylcholine and glutamate release from cholinergic neurons of the rat medial septum and diagonal band of Broca via mechanisms mediated by p75NTR. *The Journal of Neuroscience* 28: 1404–1409.
- Hunyady B, Hoffman B, Eisenhofer G, Hansson S, Mezey É (1997) Dopaminergic characteristics of isolated parietal cells from rats. *Journal of Physiology* 91: 247–256.
- Iwatsuki K, Ichikawa R, Hiasa M, Moriyama Y, Torii K, Uneyama H (2009) Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388: 1–5.
- Jiang L, Alber J, Wang J, Du W, Yang X, Li X, Sanglard D, Geyer J (2012) The *Candida albicans* plasma membrane protein Rch1p, a member of the vertebrate SLC10 carrier family, is a novel regulator of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *The Biochemical Journal* 444: 497–502.
- Jiang Y, Wu J, Hua Y, Keep RF, Xiang J, Hoff JT, Xi G (2002) Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22: 404–410.

- Johansson IM, Birzniece V, Lindblad C, Olsson T, Bäckström T (2002) Allopregnanolone inhibits learning in the Morris water maze. *Brain Research* 934: 125–131.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG (1998) Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4029–4034.
- Jonker JW, Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308: 2–9.
- Jørgensen JR, Juliusson B, Henriksen KF, Hansen C, Knudsen S, Petersen TN, Blom N, Seiger A, Wahlberg LU (2006) Identification of novel genes regulated in the developing human ventral mesencephalon. *Experimental Neurology* 198: 427–437.
- Kalueff A V, Fox MA, Gallagher PS, Murphy DL (2007) Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes, Brain, and Behavior* 6: 389–400.
- Kawano M, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H, Hisano S (2006) Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 498: 581–592.
- Kilty JE, Lorang D, Amara SG (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* 254: 578–579.
- Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun A-Q, Ananthanarayanan M et al. (2002) Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca²⁺-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 122: 1941–1953.
- Kim DS, Szczypka MS, Palmiter RD (2000) Dopamine-deficient mice are hypersensitive to dopamine receptor agonists. *The Journal of Neuroscience* 20: 4405–4413.
- König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D (2014) Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁽⁺⁾/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *Journal of Hepatology* 61: 867–875.
- Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhsen A, Heuer H, Becker W et al. (1999a) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁽⁺⁾/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *Journal of Lipid Research* 40: 1604–1617.
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Böker C, Oswald M, Grützner U, Hagenbuch B et al. (1997) Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113: 1295–1305.
- Langston JW (1987) MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *European Neurology* 26 Suppl 1: 2–10.
- Lapish CC, Seamans JK, Chandler LJ (2006) Glutamate-dopamine cotransmission and reward processing in addiction. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 30: 1451–1465.
- Larhammar M, Patra K, Blunder M, Emilsson L, Peuckert C, Arvidsson E et al. (2014) SLC10A4 Is a Vesicular Amine-Associated Transporter Modulating Dopamine Homeostasis. *Biological Psychiatry*: pii: S0006–3223(14)00550–2 DOI: 10.1016/j.biopsych.

- Larsson M, Sawada K, Morland C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y, Gundersen V (2012) Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral Cortex* 22: 1203–1214.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, DeGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF (1997) Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 2714–2721.
- Lazarowski ER, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Kreda SM (2011) Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Advances in Pharmacology* 61: 221–261.
- Lee B, Bokryeon L, Kano K, Young J, John SWM, Nishina PM, Naggert JK, Naito K (2009) A novel ENU-induced mutation, peewee, causes dwarfism in the mouse. *Mammalian Genome* 20: 404–413.
- Lee W-K, Wolff NA, Thévenod F (2009) Organic cation transporters: physiology, toxicology and special focus on ethidium as a novel substrate. *Current Drug Metabolism* 10: 617–631.
- Lesch KP, Aulakh CS, Wolozin BL, Tolliver TJ, Hill JL, Murphy DL (1993) Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. *Brain Research. Molecular Brain Research* 17: 31–35.
- Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P (1994) Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission* 95: 157–162.
- Lesch KP, Wolozin BL, Estler HC, Murphy DL, Riederer P (1993) Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. *Journal of Neural Transmission* 91: 67–72.
- Liang Y-J, Zhen J, Chen N, Reith MEA (2009) Interaction of catechol and non-catechol substrates with externally or internally facing dopamine transporters. *Journal of Neurochemistry* 109: 981–994.
- Lima R de F, Prado VF, Prado MAM, Kushmerick C (2010) Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *Journal of Neurochemistry* 113: 943–951.
- Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H (2005) Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33: 79–88.
- Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH et al. (2003) Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biological Psychiatry* 54: 960–971.
- Liu Y, Edwards RH (1997) Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporters in PC12 cells but not CHO cells. *The Journal of Cell Biology* 139: 907–916.
- Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Privé GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH (1992) A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70: 539–551.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Martins-Silva C, De Jaeger X, Guzman MS, Lima RDF, Santos MS, Kushmerick C et al. (2011) Novel strains of mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter: insights on transcriptional regulation and control of locomotor behavior. *PloS One* 6: e17611.

Martyn AC, De Jaeger X, Magalhães AC, Kesarwani R, Gonçalves DF, Raulic S et al. (2012) Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 17651–6.

Masson J, Sagne C, Hamon M, Mestikawy S El (1999) Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System. *Pharmacological Reviews* 51: 439–464.

Masuda M, Ichikawa Y, Shimono K, Shimizu M, Tanaka Y, Nara T, Miyauchi S (2014) Electrophysiological characterization of human Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (hNTCP) heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 562: 115–121.

Mathews TA, Fedele DE, Coppelli FM, Avila AM, Murphy DL, Andrews AM (2004) Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *Journal of Neuroscience Methods* 140: 169–181.

McLaughlin DP, Little KY, López JF, Watson SJ (1996) Expression of serotonin transporter mRNA in human brainstem raphe nuclei. *Neuropsychopharmacology* 15: 523–529.

Mellon SH, Griffin LD (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13: 35–43.

Mentis GZ, Alvarez FJ, Bonnot A, Richards DS, Gonzalez-Forero D, Zerda R, O'Donovan MJ (2005) Noncholinergic excitatory actions of motoneurons in the neonatal mammalian spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 7344–7349.

Merickel A, Edwards RH (1995) Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology* 34: 1543–1547.

Mezey E, Eisenhofer G, Harta G, Hansson S, Gould L, Hunyady B, Hoffman BJ (1996) A novel nonneuronal catecholaminergic system: exocrine pancreas synthesizes and releases dopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10377–10382.

Miller GM, Yatin SM, De La Garza R, Goulet M, Madras BK (2001) Cloning of dopamine, norepinephrine and serotonin transporters from monkey brain: relevance to cocaine sensitivity. *Brain Research* 87: 124–143.

Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR (2002) Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36: 635–648.

Mitsuma T, Rhue H, Hirooka Y, Kayama M, Wago T, Takagi J et al. (1998) Distribution of Dopamine Transporter in the Rat: an Immunohistochemical Study. *Endocrine Regulations* 32: 71–75.

Miyaji T, Sawada K, Omote H, Moriyama Y (2011) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 42881–42887.

Mooslehner KA, Chan PM, Xu W, Liu L, Smadja C, Humby T, Allen ND, Wilkinson LS, Emson PC (2001) Mice with very low expression of the vesicular monoamine transporter 2 gene survive into adulthood: potential mouse model for parkinsonism. *Molecular and Cellular Biology* 21: 5321–5331.

- Moran LB, Duke DC, Deprez M, Dexter DT, Pearce RKB, Graeber MB (2006) Whole genome expression profiling of the medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 7: 1–11.
- Morice E, Denis C, Giros B, Nosten-Bertrand M (2004) Phenotypic expression of the targeted null-mutation in the dopamine transporter gene varies as a function of the genetic background. *The European Journal of Neuroscience* 20: 120–126.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- Murphy DL, Lesch K-P (2008) Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 85–96.
- Nagy PM, Aubert I (2012) Overexpression of the vesicular acetylcholine transporter increased acetylcholine release in the hippocampus. *Neuroscience* 218: 1–11.
- Nakata T, Matsui T, Kobayashi K, Kobayashi Y, Anzai N (2013) Organic cation transporter 2 (SLC22A2), a low-affinity and high-capacity choline transporter, is preferentially enriched on synaptic vesicles in cholinergic neurons. *Neuroscience* 252: 212–221.
- Nakata K, Okuda T, Misawa H (2004) Ultrastructural localization of high-affinity choline transporter in the rat neuromuscular junction: enrichment on synaptic vesicles. *Synapse* 53: 53–56.
- Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, Edwards RH, Pickel VM (1996) Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *The Journal of Neuroscience* 16: 4135–4145.
- Nörenberg W, Illes P (2000) Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 324–339.
- Oelkers P, Dawson PA (1995) Cloning and chromosomal localization of the human ileal lipid-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1257: 199–202.
- Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA (1997) Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *The Journal of Clinical Investigation* 99: 1880–1887.
- Okuda T, Haga T (2000) Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Letters* 484: 92–97.
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature Neuroscience* 3: 120–125.
- Okuda T, Okamura M, Kaitsuka C, Haga T, Gurwitz D (2002) Single nucleotide polymorphism of the human high affinity choline transporter alters transport rate. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 45315–45322.
- Okuda T, Osawa C, Yamada H, Hayashi K, Nishikawa S, Ushio T et al. (2012) Transmembrane topology and oligomeric structure of the high-affinity choline transporter. *The Journal of biological chemistry* 287: 42826–34.
- Omote H, Moriyama Y (2013) Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. *Physiology* 28: 39–50.

- Owens MJ, Nemeroff CB (1998) The serotonin transporter and depression. *Depression and Anxiety* 8 Suppl 1: 5–12.
- Oya M, Kitaguchi T, Yanagihara Y, Numano R, Kakeyama M, Ikematsu K, Tsuboi T (2013) Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438: 145–151.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 452: 589–597.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2007) Quantal release of ATP in mouse cortex. *The Journal of General Physiology* 129: 257–265.
- Paolone G, Mallory CS, Koshy Cherian A, Miller TR, Blakely RD, Sarter M (2013) Monitoring cholinergic activity during attentional performance in mice heterozygous for the choline transporter: a model of cholinergic capacity limits. *Neuropharmacology* 75: 274–285.
- Parsons SM (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB Journal* 14: 2423–2434.
- Patra K, Lyons DJ, Bauer P, Hilscher MM, Sharma S, Leão RN, Kullander K (2014) A role for solute carrier family 10 member 4, or vesicular aminergic-associated transporter, in structural remodelling and transmitter release at the mouse neuromuscular junction. *The European Journal of Neuroscience*.
- Pelis RM, Wright SH (2014) SLC22, SLC44, and SLC47 transporters--organic anion and cation transporters: molecular and cellular properties. *Current Topics in Membranes* 73: 233–261.
- Peter D, Jimenez J, Liu Y, Kim J, Edwards RH (1994) The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 7231–7237.
- Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH (1995) Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *The Journal of Neuroscience* 15: 6179–6188.
- Platte HD, Honscha W, Schuh K, Petzinger E (1996) Functional characterization of the hepatic sodium-dependent taurocholate transporter stably transfected into an immortalized liver-derived cell line and V79 fibroblasts. *European Journal of Cell Biology* 70: 54–60.
- Popova SN, Alafuzoff I (2013) Distribution of SLC10A4, a Synaptic Vesicle Protein in the Human Brain, and the Association of this Protein with Alzheimer's Disease-Related Neuronal Degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 37: 603–610.
- Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E et al. (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51: 601–612.
- Prado MA., Reis RA., Prado V., de Mello MC, Gomez M V, de Mello FG (2002) Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International* 41: 291–299.
- Prado VF, Roy A, Kolisnyk B, Gros R, Prado MAM (2013) Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *The Biochemical Journal* 450: 265–274.
- Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Risso S, DeFelice LJ, Blakely RD (1997) Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. *The Journal of Neuroscience* 17: 45–57.

Qian Y, Melikian HE, Rye DB, Levey AI, Blakely RD (1995) Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *The Journal of Neuroscience* 15: 1261–1274.

Ralph RJ, Paulus MP, Fumagalli F, Caron MG, Geyer MA (2001) Prepulse inhibition deficits and perseverative motor patterns in dopamine transporter knock-out mice: differential effects of D1 and D2 receptor antagonists. *The Journal of Neuroscience* 21: 305–313.

Ramamoorthy S, Bauman a L, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang a S, Ganapathy V, Blakely RD (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 2542–2546.

Redman RS, Silinsky EM (1994) ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *The Journal of Physiology* 477: 117–127.

Rhodes ME, Li P-K, Flood JF, Johnson DA (1996) Enhancement of hippocampal acetylcholine release by the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate: an in vivo microdialysis study. *Brain Research* 733: 284–286.

Ribeiro FM, Alves-Silva J, Volkandt W, Martins-Silva C, Mahmud H, Wilhelm a. et al. (2003) The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry* 87: 136–146.

Ribeiro FM, Black SAG, Cregan SP, Prado VF, Prado MAM, Rylett RJ, Ferguson SSG (2005) Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *Journal of Neurochemistry* 94: 86–96.

Ribeiro FM, Black SAG, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SSG, Prado MAM (2006) The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. *Journal of Neurochemistry* 97: 1–12.

Ribeiro FM, Pinthong M, Black SAG, Gordon AC, Prado VF, Prado MAM, Rylett RJ, Ferguson SSG (2007) Regulated recycling and plasma membrane recruitment of the high-affinity choline transporter. *The European Journal of Neuroscience* 26: 3437–3448.

Richards DS (2009) Characterization of excitatory amino acid neurotransmitters at motoneuron synapses contacting renshaw cells.

Richman A, Tyhurst JS (1955) An extrapyramidal syndrome with reserpine. *Canadian Medical Association Journal* 72: 457–458.

Rizo J, Südhof TC (2012) The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 279–308.

Rodrigues HA, Fonseca M de C, Camargo WL, Lima PMA, Martinelli PM, Naves LA, Prado VF, Prado MAM, Guatimosim C (2013) Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PloS One* 8: e78342.

Rodriguez RM, Chu R, Caron MG, Wetsel WC (2004) Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice. *Behavioural Brain Research* 148: 185–198.

Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi A, Gundersen CB, Brecha N, Edwards RH (1994) Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10620–10624.

Ruberg M, Mayo W, Brice A, Duyckaerts C, Hauw JJ, Simon H, LeMoal M, Agid Y (1990) Choline acetyltransferase activity and [3H]vesamicol binding in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and rats with basal forebrain lesions. *Neuroscience* 35: 327–333.

Rudnick G, Wall SC (1992a) The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1817–1821.

Rudnick G, Wall SC (1992b) p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters. *Biochemistry* 31: 6710–6718.

Ryten M, Koshi R, Knight GE, Turmaine M, Dunn P, Cockayne DA, Ford APW, Burnstock G (2007) Abnormalities in neuromuscular junction structure and skeletal muscle function in mice lacking the P2X2 nucleotide receptor. *Neuroscience* 148: 700–711.

Saeki T, Matoba K, Furukawa H, Kirifuji K, Kanamoto R, Iwami K (1999) Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *Journal of Biochemistry* 125: 846–851.

Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K et al. (2014) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Scientific Reports* 4: 6689.

Sámano C, Cifuentes F, Morales MA (2012) Neurotransmitter segregation: functional and plastic implications. *Progress in Neurobiology* 97: 277–287.

Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual Review of Neuroscience* 22: 389–442.

Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 5683–5686.

Schmid JA, Just H, Sitte HH (2001) Impact of oligomerization on the function of the human serotonin transporter. *Biochemical Society Transactions* 29: 732–736.

Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B (1998) Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *The American Journal of Physiology* 274: G370–375.

Schweigmann H, Sánchez-Guijo A, Ugele B, Hartmann K, Hartmann MF, Bergmann M et al. (2014) Transport of the placental estriol precursor 16 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16 α -OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and NTCP-HEK293 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 143: 259–265.

Schweizer FE, Ryan TA (2006) The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology* 16: 298–304.

Sesma JI, Kreda SM, Okada SF, van Heusden C, Moussa L, Jones LC et al. (2013) Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *American Journal of Physiology* 304: C976–984.

- Shibley H, Smith BN (2002) Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy Research* 49: 109–120.
- Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254: 576–578.
- Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ (1995) Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *The Journal of Clinical investigation* 95: 745–754.
- Sitte HH, Huck S, Reither H, Boehm S, Singer EA, Pifl C (2002) Carrier-Mediated Release, Transport Rates, and Charge Transfer Induced by Amphetamine, Tyramine, and Dopamine in Mammalian Cells Transfected with the Human Dopamine Transporter. *Journal of Neurochemistry* 71: 1289–1297.
- Slijepcevic D, Kaufman C, Wichers CGK, Gilgioni EH, Lempp FA, Duijst S et al. (2015) Impaired uptake of conjugated bile acids and Hepatitis B Virus preS1-binding in Na(+) - taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology*: DOI: 10.1002/hep.27694.
- Spielewoy C, Biala G, Roubert C, Hamon M, Betancur C, Giros B (2001) Hypolocomotor effects of acute and daily d-amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Psychopharmacology* 159: 2–9.
- Spielewoy C, Roubert C, Hamon M, Nosten-Bertrand M, Betancur C, Giros B (2000) Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behavioural Pharmacology* 11: 279–290.
- Splinter P-L, Lazaridis K-N, Dawson P-A, LaRusso N-F (2006) Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein. *World Journal of Gastroenterology* 12: 6797–6805.
- Spolidório PCM, Echeverry MB, Iyomasa M, Guimarães FS, Del Bel EA (2007) Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology* 195: 183–192.
- Sreedharan S, Shaik JHA, Olszewski PK, Levine AS, Schiöth HB, Fredriksson R (2010) Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC Genomics* 11: 17.
- Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier PJ (1994) In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107: 1781–1787.
- Strata P, Harvey R (1999) Dale's principle. *Brain Research Bulletin* 50: 349–350.
- Striggow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G (2000) The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 2264–2269.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience* 27: 509–547.
- Sun A-Q, Balasubramaniyan N, Chen H, Shahid M, Suchy FJ (2006) Identification of functionally relevant residues of the rat ileal apical sodium-dependent bile acid cotransporter. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 16410–16418.

- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Uhl GR (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9938–9943.
- Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S (2010) Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 17406–17416.
- Travis ER, Wang YM, Michael DJ, Caron MG, Wightman RM (2000) Differential quantal release of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 162–167.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29: 52, 54.
- Truong JG, Rau KS, Hanson GR, Fleckenstein AE (2003) Pramipexole increases vesicular dopamine uptake: implications for treatment of Parkinson's neurodegeneration. *European Journal of Pharmacology* 474: 223–226.
- Uhl GR (1998) Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 43: 555–60.
- Uhl GR, Vandenbergh DJ, Miner LL (1996) Knockout mice and dirty drugs. Drug addiction. *Current Biology* 6: 935–936.
- Ungerstedt U (1968) 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology* 5: 107–110.
- Usdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 11168–11171.
- Vallée M, Mayo W, Darnaudéry M, Corpéchet C, Young J, Koehl M et al. (1997) Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 14865–14870.
- Vandenbergh DJ, Persico AM, Uhl GR (1992) A human dopamine transporter cDNA predicts reduced glycosylation, displays a novel repetitive element and provides racially-dimorphic TaqI RFLPs. *Brain Research* 15: 161–166.
- Van der Kloot W (2003) A chloride channel blocker reduces acetylcholine uptake into synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *Brain Research* 961: 287–289.
- Varoqui H, Erickson JD (1996) Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 27229–27232.
- Varoqui H, Schäfer MKH, Zhu H, Weihe E, Erickson JD (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *The Journal of Neuroscience* 22: 142–155.

Visser WE, Wong WS, van Mullem AAA, Friesema ECH, Geyer J, Visser TJ (2010) Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Molecular and Cellular Endocrinology* 315: 138–145.

Walker JK, Gainetdinov RR, Mangel AW, Caron MG, Shetzline MA (2000) Mice lacking the dopamine transporter display altered regulation of distal colonic motility. *American Journal of Physiology* 279: G311–318.

Wang YM, Gainetdinov RR, Fumagalli F, Xu F, Jones SR, Bock CB, Miller GW, Wightman RM, Caron MG (1997) Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron* 19: 1285–1296.

Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics* 5: 88.

Weihe E, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE (1994) Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. *Journal of Molecular Neuroscience* 5: 149–164.

Weinman SA (1997) Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 70: 331–340.

Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA (1998) Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 34691–34695.

Wisor JP, Nishino S, Sora I, Uhl GH, Mignot E, Edgar DM (2001) Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *The Journal of Neuroscience* 21: 1787–1794.

Wolf OT, Kirschbaum C (1999) Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans. *Brain Research* 30: 264–288.

Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 1340–1347.

Wright SH, Dantzer WH (2004) Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiological Reviews* 84: 987–1049.

Wu X, Gu HH (1999) Molecular cloning of the mouse dopamine transporter and pharmacological comparison with the human homologue. *Gene* 233: 163–170.

Wulsch T, Grimberg G, Schmitt A, Painsipp E, Wetzstein H, Breitenkamp AFS et al. (2009) Decreased anxiety in mice lacking the organic cation transporter 3. *Journal of Neural Transmission* 116: 689–697.

Xi G, Reiser G, Keep RF (2003) The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *Journal of Neurochemistry* 84: 3–9.

Xing J, Lu J, Li J (2008) Purinergic P2X receptors presynaptically increase glutamatergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray. *Brain Research* 1208: 46–55.

Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, Wang YM, Caron MG (2000) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nature Neuroscience* 3: 465–471.

- Yamaguchi T, Sheen W, Morales M (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *The European Journal of Neuroscience* 25: 106–118.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z et al. (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 1: e00049.
- Yanni SB, Augustijns PF, Benjamin DK, Brouwer KLR, Thakker DR, Annaert PP (2010) In vitro investigation of the hepatobiliary disposition mechanisms of the antifungal agent micafungin in humans and rats. *Drug Metabolism and Disposition* 38: 1848–1856.
- Yoshikawa M, Uchida S, Ezaki J, Rai T, Hayama A, Kobayashi K et al. (2002) CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes to Cells* 7: 597–605.
- Yoshiki A, Moriwaki K (2006) Mouse phenome research: implications of genetic background. *Institute of Laboratory Animal Resources Journal* 47: 94–102.
- Zahniser NR, Sorkin A (2004) Rapid regulation of the dopamine transporter: role in stimulant addiction? *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 80–91.
- Zahniser NR, Sorkin A (2009) Trafficking of dopamine transporters in psychostimulant actions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 411–417.
- Zelano J, Mikulovic S, Patra K, Kühnemund M, Larhammar M, Emilsson L, Leao R, Kullander K (2013) The synaptic protein encoded by the gene *Slc10A4* suppresses epileptiform activity and regulates sensitivity to cholinergic chemoconvulsants. *Experimental Neurology* 239: 73–81.
- Zheng P (2009) Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology* 89: 134–152.
- Zhou Q, Li J, Wang H, Yin Y, Zhou J (2011) Identification of nigral dopaminergic neuron-enriched genes in adult rats. *Neurobiology of Aging* 32: 313–326.

9 Anhang

Tab. 9.1: Auflistung der SLC10A4-Transkripte verschiedener Spezies

Die aufgeführten Daten wurden mit bioinformatischer Analyse der Sequenzen ermittelt.
(Stand: Mai. 2015)

Spezies	Accession-No. Protein	Accession-No. Nucleotid	Proteinlänge (AS)	Cds (bp)	Chro- som
<i>Equus caballus</i> (Hauspferd)	XP_001917172.1	XM_001917137.1	442	1329	3
<i>Sus scrofa</i> (Hausschwein)	XP_003129015.2	XM_003128967.2	432	1299	8
<i>Canis lupus familiaris</i> (Haushund)	XP_005628227.1	XM_005628170.1	321	966	13
<i>Cavia porcellus</i> (Meerschweinchen)	XP_003471622.1	XM_003471574.1	422	1269	unknown
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Kaninchen)	XP_002709473.1	XM_002709427	435	1308	2
<i>Gallus gallus</i> (Bankivahuhn)	XP_001233594.2	XM_001233593.3	368	1107	4
<i>Cricetulus griseus</i> (Chines. Zwerghamster)	XP_003512251.1	XM_003512203	437	1314	unknown
<i>Cricetulus griseus</i> (Chines. Zwerghamster)	XP_007612060.1	XM_007613870.1	436	1311	unknown
<i>Xenopus tropicalis</i> (Tropischer Krallenfrosch)	XP_002933503.1	XM_002933457.2	407	1224	unknown
<i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)	XP_001103529.1	XM_001103529.1	436	1311	5
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (Schnabeltier)	XP_001515775.2	XM_001515725	227	684 partial	
<i>Pongo abelii</i> (Sumatra-Orang-Utan)	XP_002814774.1	XM_002814728.1	437	1314	4
<i>Monodelphis domestica</i> (Spitzmausbeutelratte)	XP_001372055.1	XM_001372018	499	1500	5
<i>Loxodonta africana</i> (Afrikanischer Elefant)	XP_003415916.1	XM_003415868	441	1326	unknown
<i>Nomascus leucogenys</i> (Nördlicher Weißwangenschopfgibbon)	XP_003258477.1	XM_003258429.1	437	1314	unknown
<i>Taeniopygia guttata</i> (Zebrafink)	XP_002193862.2	XM_002193826.2	540	1623	4
<i>Meleagris gallopavo</i> (Truthuhn)	XP_003205876.1	XM_003205828	317	954 partial	4
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (Großer Panda)	XP_002917062.1	XM_002917016	367	1104	unknown
<i>Heterocephalus glaber V1</i> (Nacktmull)	XP_004849904.1	XM_004849847	420	1263	unknown
<i>Heterocephalus glaber V2</i> (Nacktmull)	XP_004888821	XM_004888764	367	1104	unknown
<i>Oreochromis niloticus</i> (Buntbarsch)	XP_003439818.1	XM_003439770	349	1050	unknown
<i>Pan troglodytes</i> (Gemeiner Schimpanse)	XP_526625.3	XM_526625.3	321	966	4
<i>Ciona intestinalis</i> (Schlauchseescheide)	XP_002124965.1	XM_002124929	998	2997	
<i>Chinchilla lanigera</i> (Langschwanz-Chinchilla)	XP_005393028.1	XM_005392971.1	347	1044 partial	unknown

<i>Spermophilus tridecemlineatus</i> (Dreizehnstreifenziegel)	XP_005320041.1	XM_005319984.1	439	1320	unknown
<i>Microtus ochrogaster</i> (Präriewühlmaus)	XP_005359390	XM_005359333.1	437	1314	unknown
<i>Chrysemys picta bellii</i> (Zierschildkröte)	XP_005299116	XM_005299059.1	390	1173	unknown
<i>Falco peregrinus</i> (Wanderfalke)	XP_005232209.1	XM_005232152	316	951	unknown
<i>Ficedula albicollis</i> (Halsbandschnäpper)	XP_005045389.1	XM_005045332.1	503	1513	4
<i>Mesocricetus auratus</i> (Goldhamster)	XP_005080871	XM_005080814	203	612	unknown
<i>Anas platyrhynchos</i> (Stockente)	XP_005013815.1	XM_005013758	180	543 partial 1611	unknown
<i>Mustela putorius furo</i> (Frettchen)	XP_004804192	XM_004804135 .1	536	1320	unknown
<i>Mustela putorius furo</i> (Frettchen)	XP_004764989	XM_004764932	439	1320	unknown
<i>Condylura cristata</i> (Sternmull)	XP_004681361	XM_004681304	440	1323	unknown
<i>Echinops telfairie</i> (Kleiner Igeltenrek)	XP_004706334.1	XM_004706277.1	441	1326	unknown
<i>Octodon degus</i> (Gewöhnlicher Degu)	XP_004627626.1	XM_004627569.1	395	1188 partial 1305	unknown
<i>Jaculus jaculus</i> (Wüstenspringmaus)	XP_004658746.1	XM_004658689.1	434	1311	unknown
<i>Sorex araneus</i> (Waldspitzmaus)	XP_004608100.1	XM_004608043.1	436	1302	unknown
<i>Ochotona princeps</i> (Amerik. Pfeifhase)	XP_004579171.1	XM_004579114.1	433	1089	unknown
<i>Dasypus novemcinctus</i> (Neunbinden-Gürteltier)	XP_004469840.1	XM_004469783.1	362	1320	unknown
<i>Ceratotherium simum simum</i> (Breitmaulnashorn)	XP_004419102.1	XM_004419045.1	439	1320	unknown
<i>Odobenus rosmarus divergens</i> (Walross)	XP_004396349.1	XM_004396292.1	439	1320	unknown
<i>Trichechus manatus latirostris</i> (Seekuh)	XP_004382973.1	XM_004382916.1	439	1320	unknown
<i>Tursiops truncatus</i> (Großer Tümmler)	XP_004327987.1	XM_004327939.1	439	1320	unknown
<i>Orcinus orca</i> (Schwertwal)	XP_004268336.1	XM_004268288.1	439	1320	unknown
<i>Gorilla gorilla gorilla</i> (Flachlandgorilla)	XP_004038695.1	XM_004038647.1	437	1314	4
<i>Ovis aries</i> , X1 (Hausschaf)	XP_004010111.1	XM_004010062.1	385	1158 partial 1371	6
<i>Ovis aries</i> , X2 (Hausschaf)	XP_012009648.1	XM_012154258.1	456	1152	unknown
<i>Felis catus</i> (Hauskatze)	XP_003985499.1	XM_003985450.1	383	1332	B1
<i>Samiri boliv.boliviensis</i> (Boliv. Totenkopffaffe)	XP_003933688.1	XM_003933639.1	443	1311	unknown
<i>Papio anubis</i> (Anubispavian)	XP_003898709.1	XM_003898660.1	436	5	unknown
<i>Pan paniscus</i> (Zwergschimpanse)	XP_003816081.1	XM_003816033.1	377	1134	unknown

<i>Otolemur garnettii</i> (Riesengalago)	XP_003794639.1	XM_003794591.1	445	1338	unknown
<i>Sarcophilus harrisii</i> (Tasmanischer Teufel)	XP_003773322.1	XM_003773274.1	451	1356	6
<i>Falco cherrug</i> (Sakerfalke)	XP_005433680.1	XM_005433623.1	340	1023	unknown
<i>Zonotrichia albicollis</i> (Weißkehlammer)	XP_005490090.1	XM_005490033.1	152	459	unknown
<i>Pseudopodoces humilis</i> (Tibetmeise)	XP_005517782.1	XM_005517725.1	368	1107	unknown
<i>Geospiza fortis</i> (Mittel-Grundfink)	XP_005415701.1	XM_005415644.1	291	876	unknown
<i>Columba livia</i> (Felsentaube)	XP_005516174.1	XM_005516117.1	326	981	unknown
<i>Macaca fascicularis</i> (Javaneraffe)	XP_005554907.1	XM_005554850.1	436	1311	5
<i>Capra hircus</i> (Hausziege)	XP_005681653.1	XM_005681596.1	251	756	6
<i>Myotis brandtii</i> (Brandtfledermaus)	XP_005853229.1	XM_005853167.1	386	1161	unknown
<i>Bos mutus</i> (Yak)	XP_005897688.1	XM_005897626.1	377	1134	unknown
<i>Latimeria chalumnae</i> (Komoren-Quastenflosser)	XP_005998625.1	XM_005998563.1	421	1266	unknown
<i>Pantholops hodgsonii</i> (Tibetantilope)	XP_005985833.1	XM_005985771.1	346	1041	unknown
<i>Alligator sinensis</i> (China-Alligator)	XP_006019093.1	XM_006019031.1	183	partial 552	unknown
<i>Pelodiscus sinensis</i> (Chinesische Weichschildkröte)	XP_006113575.1	XM_006113513.1	400	1203	unknown
<i>Myotis lucifugus</i> (Mausohrfledermäuse)	XP_006101338.1	XM_006101276.1	441	1326	unknown
<i>Vicugna pacos</i> (Alpaka)	XP_006198174.1	XM_006198112.1	321	966	unknown
<i>Camelus ferus</i> (Trampeltier)	XP_006186015.1	XM_006185953.1	252	759	unknown
<i>Tupaia chinensis</i> (Eigentlichen Spitzhörnchen)	XP_006172314.1	XM_006172252.1	534	1605	unknown
<i>Alligator mississippiensis</i> (Mississippi-Alligator)	XP_006263637.1	XM_006263575.1	345	1039	unknown
<i>Myotis davidii</i> (Davids Mausohrfledermäuse)	XP_006759324.1	XM_006759261.1	244	partial 735	unknown
<i>Leptonychotes weddellii</i> (Weddellrobbe)	XP_006740955.1	XM_006740892.1	437	1314	unknown
<i>Elephantulus edwardii</i> (Kap-Elefantenspitzmaus)	XP_006894220.1	XM_006894158.1	445	1338	unknown
<i>Pteropus alecto</i> (Schwarzer Flughund)	XP_006922548.1	XM_006922486.1	446	1341	unknown
<i>Chrysochloris asiatica</i> (Kapgoldmull)	XP_006872732.1	XM_006872670.1	439	1320	unknown
<i>Peromyscus maniculatus</i> (Hirschmaus)	XP_006979754.1	XM_006979692.1	437	1314	unknown
<i>Panthera tigris altaica</i> (Sibirischer Tiger)	XP_007075990.1	XM_007075928.1	375	1128	unknown
<i>Chelonia mydas</i> (Suppenschildkröte)	XP_007071091.1	XM_007071029.1	302	909	unknown
<i>Physeter catodon</i> (Pottwal)	XP_007114582.1	XM_007114520.1	439	partial 1320	unknown

<i>Bubalus bubalis</i> (Wasserbüffel)	XP_006057790.1	XM_006057728.1	450	1353	unknown
<i>Balaenoptera acutorostrata</i> (Zwergwal)	XP_007180831.1	XM_007180769.1	439	1320	unknown
<i>Astyanax mexicanus</i> (Blinder Höhlensalmmler)	XP_007257115.1	XM_007257053.1	389	1170	unknown
<i>Lipotes vexillifer</i> (Chinesischer Flussdelfin)	XP_007456163.1	XM_007456101.1	439	1320	unknown
<i>Python bivittatus</i> (Tigerpython)	XP_007435002.1	XM_007434940.1	504	1515	unknown
<i>Poecilia formosa</i> (Amazonenkärpfling)	XP_007550851.1	XM_007550789.1	414	1281	unknown
<i>Erinaceus europaeus</i> (Braunbrustigel)	XP_007539753.1	XM_007539691.1	434	1245	unknown
<i>Callorhinchus milii</i> (Pflugnasenchimäre)	XP_007891033.1	XM_007892842.1	406	1221	unknown
<i>Chlorocebus sabaeus</i> (Westliche Grünmeerkatze)	XP_008015631.1	XM_008017440.1	437	1314	27
<i>Orycteropus afer afer</i> (Erdferkel)	XP_007947628.1	XM_007949437.1	433	1302	unknown
<i>Tarsius syrichta</i> (Philippinen-Koboldmaki)	XP_008057136.1	XM_008058945.1	335	1008	unknown
<i>Eptesicus fuscus</i> (Große braune Fledermaus)	XP_008138511.1	XM_008140289.1	441	1326	unknown
<i>Chrysemys picta bellii</i> (Zierschildkröte)	XP_005299116.1	XM_005299059.1	390	1173	4
<i>Cynoglossus semilaevis</i> (Hundszungen)	XP_008334345.1	XM_008336123.1	417	1254	2
<i>Stegastes partitus</i> (Zweifارben-Riffbarsch)	XP_008297254.1	XM_008299032.1	420	1263	unknown
<i>Poecilia reticulata</i> (Guppy)	XP_008405724.1	XM_008407502.1	414	1245	-
<i>Calypste anna</i> (Annakolibri)	XP_008490134.1	XM_008491912.1	313	942	unknown
<i>Equus przewalskii</i> (Przewalski-Pferd)	XP_008519852.1	XM_008521630.1	401	1206	unknown
<i>Galeopterus variegatus</i> (Malaien-Gleitflieger)	XP_008578517.1	XM_008580295.1	437	1314	unknown
<i>Corvus brachyrhynchos</i> (Amerikanerkrähe)	XP_008639744.1	XM_008641522.1	326	981	unknown
<i>Ursus maritimus</i> (Eisbär)	XP_008699738.1	XM_008701516.1	484	1455	unknown
<i>Nannospalax galili</i>	XP_008835927.1	XM_008837705.1	434	1305	unknown
<i>Manacus vitellinus</i> (Goldbandpipra)	XP_008925742.1	XM_008927494.1	194	585	unknown
<i>Callithrix jacchus</i> , X2 (Weißbüschelaffe)	XP_008991624.1	XM_008993376.1	443	1332	3
<i>Callithrix jacchus</i> , X2 (Weißbüschelaffe)	XP_008991623.1	XM_008993375.1	443	1332	3
<i>Merops nubicus</i> (Scharlachspint)	XP_008939040.1	XM_008940792.1	245	738	unknown
<i>Acanthisitta chloris</i> (Grünschlüpfer)	XP_009081562.1	XM_009083314.1	171	516	unknown
<i>Serinus canaria</i> (Kanarengirlitz)	XP_009099713.1	XM_009101465.1	406	1221	unknown
<i>Aptenodytes forsteri</i> (Kaiserpinguin)	XP_009275742.1	XM_009277467.1	214	645	unknown
<i>Pygoscelis adeliae</i> (Adeliepinguin)	XP_009333494.1	XM_009335219.1	178	537	unknown

<i>Pelecanus crispus</i> (Krauskopfpelikan)	XP_009480880.1	XM_009482605.1	171	516	unknown
<i>Nipponia nippon</i> (<i>Nipponibis</i>)	XP_009472558.1	XM_009474283.1	250	753	unknown
<i>Phalacrocorax carbo</i> (Kormoran)	XP_009500774.1	XM_009502479.1	171	516	unknown
<i>Fulmarus glacialis</i> (Eissturmvogel)	XP_009584616.1	XM_009586321.1	184	555	unknown
<i>Cuculus canorus</i> (Kuckuck)	XP_009558278.1	XM_009559983.1	367	1104	unknown
<i>Struthio camelus australis</i> (Afrikanischer Strauß)	XP_009680318.1	XM_009682023.1	323	972	unknown
<i>Egretta garzetta</i> (Seidenreiher)	XP_009640617.1	XM_009642322.1	194	585	unknown
<i>Gavia stellata</i> (Sterntaucher)	XP_009812766.1	XM_009814464.1	171	516	unknown
<i>Cariama cristata</i> (Rotfußseriema)	XP_009705564.1	XM_009707262.1	171	516	unknown
<i>Picoides pubescens</i> (Dunenspecht)	XP_009897595.1	XM_009899293.1	284	855	unknown
<i>Charadrius vociferus</i> (Keilschwanz-Regenpfeifer)	XP_009883321.1	XM_009885019.1	302	909	unknown
<i>Apaloderma vittatum</i>	XP_009863890.1	XM_009865588.1	210	633	unknown
<i>Leptosomus discolor</i> (Kuroi)	XP_009948518.1	XM_009950216.1	241	726	unknown
<i>Opisthocomus hoazin</i> (Hoatzin)	XP_009935564.1	XM_009937262.1	223	672	unknown
<i>Haliaeetus albicilla</i> (Seeadler)	XP_009928978.1	XM_009930676.1	204	615	unknown
<i>Nestor notabilis</i> (Bergpapagei)	XP_010014920.1	XM_010016618.1	169	510	unknown
<i>Chaetura pelagica</i> (Schornteinfeger)	XP_010004438.1	XM_010006136.1	200	603	unknown
<i>Tauraco erythrolophus</i> (Rothaubenturako)	XP_009980542.1	XM_009982240.1	201	606	unknown
<i>Tyto alba</i> (Schleiereule)	XP_009973327.1	XM_009975025.1	171	516	unknown
<i>Mesitornis unicolor</i> (Einfarb-Stelzenralle)	XP_010182130.1	XM_010183828.1	186	561	unknown
<i>Caprimulgus carolinensis</i> (Carolina-Nachtschwalbe)	XP_010175778.1	XM_010177476.1	171	516	unknown
<i>Eurypyga helias</i> (Sonnenralle)	XP_010155202.1	XM_010156900.1	199	600	unknown
<i>Buceros rhinoceros silvestr.</i> (Rhinozerosvogel)	XP_010137010.1	XM_010138708.1	180	543	unknown
<i>Pterocles gutturalis</i> (Gelbkehl-Flughuhn)	XP_010074956.1	XM_010076654.1	171	516	unknown
<i>Colius striatus</i> (Braunflügel-Mausvogel)	XP_010205899.1	XM_010207597.1	182	549	unknown
<i>Chlamydotis macqueenii</i> (Asiatische Kragentrappe)	XP_010113906.1	XM_010115604.1	236	711	unknown
<i>Tinamus guttatus</i> (Weißkehltnamu)	XP_010219971.1	XM_010221669.1	278	837	unknown
<i>Phaeton lepturus</i> (Weißschwanz-Tropikvogel)	XP_010291175.1	XM_010292873.1	241	726	unknown
<i>Balearica reg. gibbericeps</i> (Südafrika-Kronenkranich)	XP_010305454.1	XM_010307152.1	171	516	unknown
<i>Rhinopithecus roxellana</i> (Goldstumpfnase)	XP_010384672.1	XM_010386370.1	437	1314	unknown

<i>Corvus cornix cornix</i> (Aaskrähe)	XP_010400460.1	XM_010402158.1	182	549	unknown
<i>Haliaeetus leucocephalus</i> (Weißkopfseeadler)	XP_010572861.1	XM_010574559.1	357	1074	unknown
<i>Fukomys damarensis</i> (Damara-Graumull)	XP_010638591.1	XM_010640289.1	302	partial 909	unknown
<i>Larimichthys crocea</i> (Großer Gelbfisch)	XP_010729374.1	XM_010731072.1	411	partial 1236	unknown
<i>Esox lucius</i> (Hecht)	XP_010870464.1	XM_010872162.1	427	1284	unknown
<i>Bison bison bison</i> (Amerikanischer Bison)	XP_010857224.1	XM_010858922.1	437	1314	unknown
<i>Camelus bactrianus</i> (Trampeltier)	XP_010961007.1	XM_010962705.1	382	1149	unknown
<i>Camelus dromedarius</i> (Dromedar)	XP_010991157.1	XM_010992855.1	252	759	unknown
<i>Oryzias latipes</i> (Japanischer Reiskärpfling)	XP_004067610.1	XM_004067562.2	390	1173	4
<i>Aquila chrysaetos canad.</i> (Steinadler)	XP_011581090.1	XM_011582788.1	654	1965	unknown
<i>Takifugu rubripes</i> (Japanischer Kugelfisch)	XP_003973974.1	XM_003973925.1	407	1224	20
<i>Cercocebus atys</i> (Rußmangabe)	XP_011938180.1	XM_012082790.1	436	1311	unknown
<i>Mandrillus leucophaeus</i> (Drill)	XP_011828442.1	XM_011973052.1	438	1317	unknown
<i>Colobus angolensis</i> (Angola-Stummelaffe)	XP_011782813.1	XM_011927423.1	352	1059	unknown
<i>Macaca nemestrina</i> (Südlicher Schweinsaffe)	XP_011711109.1	XM_011712807.1	436	partial 1311	unknown
<i>Ovis aries musimon</i> , X2 (Mouflon)	XP_012009648.1	XM_012154258.1	456	1371	unknown

10 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Beginnen möchte ich mit dem Dank an meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Geyer für die Bereitstellung der Doktorarbeit und die professionelle Begleitung während der Anfertigung. Deine unermüdliche Neugier und dein Forschungsdrang haben mich oft motiviert auch in schwierigen Phasen nicht aufzugeben. Ebenso für die Hilfe bei der Fertigstellung der Publikation und für die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und Weiterbildungsveranstaltungen möchte ich dir danken.

Unserem ehemaligen Institutsleiter, Prof. Dr. Ernst Petzinger, der leider im vergangenen Jahr viel zu früh von uns gegangen ist, gebührt ein besonderer Dank. Er fand stets die richtige Balance zwischen menschlicher Nähe und Professionalität und war immer bereit Thesen kritisch zu hinterfragen. Die eine oder andere Mittagspause wurde von ihm durch einen Schwank aus seiner Jugend, einen Vortrag über Geschichte oder einen erzählten Witz bereichert. Auch die erlebten institutsinternen Weihnachtsfeiern wurden durch ihn besonders festlich und werden immer unvergesslich bleiben.

Ich bedanke mich bei Dr. Daniel Zahner, denn er war immer ein kompetenter Ansprechpartner für alle Fragen bezüglich der Mauthaltung und Mausezucht und stand uns immer mit Rat und Tat zur Seite. Auch bei Manuela Binz möchte ich mich gerne für die tiergerechte Pflege und Versorgung der Mauslinien bedanken.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Yohannes Hagos und Prof. Dr. Birgitta Christina Burckhardt, die mir durch ihre langjährige Erfahrung mit dem Expressionsmodell der *Xenopus laevis* Oozyten entscheidende Hinweise zur Verbesserung der Versuchsdurchführung geben konnten, sowie bei Prof. Dr. Wolfgang Clauss, Dr. Martin Fronius und Diplom Biologin Katrin Richter aus dem Institut für Tierphysiologie für die sehr gelungene Kooperation und Bereitstellung der *Xenopus laevis* Oozyten.

Vielen Dank an Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger und dem Institut für Veterinärphysiologie für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistologischen Experimente.

Für die Einarbeitung in zahlreiche Methoden zu Beginn meiner Doktorarbeit danke ich ganz herzlich Dr. Barbara Döring, für die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur Klaus Schuh und für die Hilfe bei der cRNA-Synthese Regina Leidolf. Ein besonderer Dank gilt außerdem Anita Neubauer, welche mit mir die nicht enden wollenden Transportexperimente an *Xenopus laevis* Oozyten durchführte und mich mit ihrem bayrischen Humor erheiterte. Ein großer Dank an dieser Stelle für das Korrekturlesen meiner Arbeit an Anita Neubauer und Dr. Barbara Döring.

Dorothee von Schnakenburg danke ich für die Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten und Christoph Zimmermann für seine Hilfestellung in allen technischen Belangen. Auch allen weiteren Mitgliedern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Meinen lieben Kollegen aus dem MDR1-Diagnostikteam, Falko Mattheis und Jessica Karn, danke ich für die sehr gute langjährige Zusammenarbeit. Durch eure Zuverlässigkeit und Motivation wurde Freiraum geschaffen, der dieser Arbeit zugutekam.

Meinen im Laufe der Jahre wechselnden Zimmerkollegen und Freunden Charlotte Strähle, Christina Ohl, Clarissa Prinzinger und Gary Grosser danke ich für die Freundschaft, den Zusammenhalt und die Hilfsbereitschaft während der Arbeitszeit und die erforderliche Ablenkung in der Freizeit. Ein besonderer Dank ist dabei für Jasmin Kranz bestimmt, die von Beginn an nicht nur das Arbeitszimmer sondern auch alle Höhen und Tiefen des Forscherlebens mit mir teilte und mich mental aber auch kulinarisch unterstützte.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Inge und Ulrich, welche mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglichten. Ihre unendliche Unterstützung, Liebe und Motivation haben einen entscheidenden Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. Auch bei meiner Schwester Katharina, meinem Bruder Christian, meiner Cousine Sina und meiner Tante Silvia möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Vielen herzlichen Dank!

11 Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

**„Funktionelle Charakterisierung des
neuronal-vesikulären Carriers SLC10A4 und Etablierung
eines Slc10a4-Knockout-Mausmodells“**

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Stephanie Schmidt



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6373-3



9 783835 196373